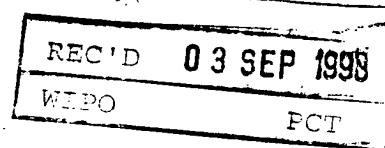


BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



PRIORITY DOCUMENT

Bescheinigung

3

Die Studiengesellschaft Kohle mbH in Mülheim an der Ruhr/
Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Verfahren zur Herstellung und Identifi-
zierung von neuen Hydrolasen mit ver-
besserten Eigenschaften"

am 25. Juli 1997 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wie-
dergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmel-
dung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die
Symbole C 12 N, C 12 P und C 12 Q der Internationalen Pa-
tentklassifikation erhalten.

München, den 5. August 1998

Der Präsident des Deutschen Patentamts
Im Auftrag

Keller

Aktenzeichen: 197 31 990.4

A 9161
6.90
(EDV-L)
01/98

Verfahren zur Herstellung und Identifizierung von neuen Hydrolasen mit verbesserten Eigenschaften

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung und Identifizierung von Hydrolase-Mutanten mit verbesserten Eigenschaften hinsichtlich ihrer Stereo- oder Regioselektivität, katalytischen Aktivität oder Stabilität bei chemischen Umsetzungen.

Stand der Technik:

Hydrolasen gehören zu den am weitesten verbreiteten Enzymen in der organischen Synthese. Als Untergruppe der Hydrolasen katalysieren insbesondere Esterasen und Lipasen eine Vielzahl von Reaktionen wie z.B. die Hydrolyse von Carbonsäureestern, oder die Synthese von Estern bzw. Umesterungen in organischen Lösungsmitteln. Ihre hohe Stereoselektivität, Stabilität und gute Verfügbarkeit machen sie für zahlreiche industrielle Prozesse interessant. So werden z.B. Lipasen bereits industriell zur Racematspaltung von chiralen Alkoholen, Säuren oder Aminen eingesetzt, für die Darstellung enantiomerenreiner Arzneimittel, Naturstoffe, Pflanzenschutzmittel oder hochwertiger Fette und Öle (K.Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer-Verlag, Berlin, 2. Aufl. 1995). Dennoch lässt sich die Enantioselektivität einer Lipase bzw. Esterase gegenüber einem gegebenen Substrat nicht mit Sicherheit vorhersagen und in vielen Fällen verlaufen die Umsetzungen nur mit mäßigen optischen Ausbeuten. Es besteht daher ein Bedarf nach einem Verfahren zur Herstellung von Hydrolasen, das eine gezielte Optimierung der Enantioselektivität hinsichtlich eines gewünschten Produktes und der speziellen Prozeßbedingungen wie Temperatur und Lösungsmittel ermöglicht. Mit Hilfe der heute gebräuchlichen molekularbiologischen Methode der *in vitro*-Mutagenese ließen sich zwar Effekte auf die Enantioselektivität von Lipasen studieren (K.Hult, M. Holmquist, M. Martinelle, *European Symposium on Biocatalysis*, Graz, 1993, Abstracts, L-4), es konnte jedoch keine

Optimierung hinsichtlich eines bestimmten Substrates erreicht werden, die zu einem organisch-synthetisch nutzbaren Enzym geführt hat.

Zu den bedeutendsten Einsatzmöglichkeiten der Gentechnik gehört das Proteindesign, bei dem auf der Grundlage bekannter Strukturdaten mit Hilfe der *in vitro*-Mutagenese basenspezifisch Mutationen in die Gensequenz des entsprechenden Proteins eingeführt werden. Durch gezielten Austausch von Aminosäuren ließen sich auf diese Weise schon Enzyme mit verbesserter katalytischer Aktivität oder Stabilität herstellen (A. Shaw, R. Bott, *Current Opinion in Structural Biology*, 1996, 6, 546). Diese Technik, die sogenannte oligonucleotidgerichtete (*oligonucleotide-directed*) oder gezielte Mutagenese (*site-directed mutagenesis*), beruht auf dem Ersatz eines kurzen Sequenzabschnitts des Gens für das natürlich vorkommende Enzym (Wildtyp) durch ein synthetisch mutagenisiertes Oligonucleotid. Nach anschließender Expression des Gens erhält man eine Enzym-Mutante, die vorteilhafte Eigenschaften aufweisen kann. In einem davon abgeleiteten Verfahren, der sogenannten Kassettenmutagenese (*cassette mutagenesis*), werden Oligonucleotide mit partiell randomisierten Sequenzen eingesetzt. Dadurch erhält man eine begrenzt große Bibliothek von Mutanten, die dann hinsichtlich ihrer Eigenschaften getestet werden kann.

Trotz der Vorteile dieser etablierten Methoden eignen sie sich nur schlecht für die schrittweise Optimierung eines Enzyms, bzw. zur Erzeugung von Enzymen mit neuen Eigenschaften. Das bis heute unvollständige Verständnis der Gesetzmäßigkeiten der Proteinfaltung und der Struktur-Funktions-Beziehung bei Proteinen ist die Hauptursache für das Scheitern vieler Projekte auf dem Gebiet des sogenannten rationalen Proteindesigns. Zudem ist ein schrittweiser Optimierungsprozeß nach der klassischen Methode relativ arbeitsaufwendig und garantiert keine signifikante Verbesserung der Enzymeigenschaften *per se*.

In jüngster Zeit wurden neue molekularbiologische Methoden zur Mutagenese beschrieben, die auf der literaturbekannten Polymerase-Kettenreaktion (R.K. Saiki, S.J. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn,

H.A. Erlich, N. Arnheim, *Science*, 1985, 230, 1350) beruhen (D.W. Leung, E. Chen, D.V. Goeddel, *Technique*, 1989, 1, 11 und W. P.C. Stemmer, A. Crameri, PCT WO 95/22625). Anstelle der gezielten Mutagenese werden hierbei kombinatorische Methoden zur Erzeugung umfangreicher Mutantenbibliotheken eingesetzt, die nachfolgend mit Hilfe geeigneter Screeningverfahren nach Mutanten mit positiven Eigenschaften durchsucht werden. Dabei werden die in der Natur vorkommenden evolutiven Prozesse der Replikation bzw. Rekombination, der Mutation und Selektion auf molekularer Ebene nachgeahmt. Diese als *in vitro*-Evolution (oder *directed evolution*) beschriebene Methode hat sich bereits in einigen Fällen als brauchbare Methode zur Gewinnung neuer Biokatalysatoren bewährt (W.P.C. Stemmer, *Nature*, 1994, 370, 389 und F.H. Arnold, *Chemical Engineering Science*, 1996, 51, 5091).

Trotz der erzielten Fortschritte auf diesem Gebiet lässt sich dieses Verfahren bisher nicht generell auf alle Enzymklassen übertragen, da es meist an geeigneten Testmethoden zur Identifizierung von Mutanten mit positiven Eigenschaften fehlt. Diese sind aber zwingend erforderlich angesichts der großen Anzahl von mutierten Enzymvarianten, die bei der Erzeugung kombinatorischer Mutantenbibliotheken zu erwarten sind. Insbesondere im Fall der für industrielle Prozesse interessanten Lipasen ist es bisher nicht gelungen, Mutanten mit verbesserter Stereoselektivität mit den Methoden der *in vitro*-Evolution zu erzeugen, weil ein effizientes Screening-Verfahren zum Test auf Enantioselektivität bis heute nicht existiert. Die klassische Methode zur Bestimmung der Enantioselektivität einer Lipase- bzw. Esterase-katalysierten Umsetzung beruht auf der flüssig-, bzw. gaschromatographischen Trennung der Reaktionsprodukte und Edukte unter Verwendung von chiral modifizierten, stationären Phasen. Diese Methode ist jedoch aufgrund des enormen Probenaufkommens im Zuge des Screenings von umfangreichen Mutantenbibliotheken ungeeignet, da chromatographische Trennungen mit chiral modifizierten Säulen zeitaufwendig sind und nur nacheinander durchgeführt werden können. Ein weiteres bisher ungelöstes Problem betrifft die häufig zu beobachtende Schwierigkeit, funktionelle Lipasen bzw. Esterasen in Wirtsorganismen mit genügend hoher Aktivitäts-

Ausbeute zu exprimieren. Dies ist jedoch für ein leistungsfähiges Screeningsystem unverzichtbar, da zu geringe Enzym-Aktivitäten bei der Bestimmung der Enantioselektivität aufgrund der begrenzten Empfindlichkeit eines Testsystems nur schwer nachzuweisen sind.

Gegenstand der Erfindung:

Der Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde, ein einfaches Verfahren zur Herstellung von mutierten Hydrolasen, insbesondere Lipasen bzw. Esterasen, mit verbesserter Stereo-, bzw. Regioselektivität, katalytischer Aktivität und Stabilität gegenüber gegebenen Substraten (z.B. Carbonsäuren, Alkoholen, Aminen sowie deren Derivaten) zu entwickeln, das zudem eine schnelle Identifizierung positiver Mutanten aus umfangreichen Mutantenbibliotheken ermöglicht, sowie die Verwendung der so hergestellten Enzyme bei der Racematspaltung von chiralen Alkoholen, Säuren und Aminen sowie deren Derivaten.

Beschreibung der Erfindung:

Die Herstellung der neuen Biokatalysatoren beginnt in der Regel mit der Isolierung eines Lipase- bzw. Esterase-Gens aus dem Ursprungsorganismus. Hierfür kommen alle mikrobiellen, pflanzlichen und tierischen Organismen in Frage, die Träger eines Lipase- bzw. Esterase-Gens sind. Die Genisolierung kann nach den literaturbekannten Methoden vorgenommen werden (J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, New York). In der Regel wird dazu die genomische DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen fragmentiert und die erhaltenen Genfragmente in einem Wirtsorganismus (z.B. *E. coli*) kloniert. Unter Verwendung von Oligonucleotiden, die sequenzhomolog zu einem Abschnitt des Lipase- bzw. Esterase-Gens sind, wird dann in Hybridisierungsexperimenten das Gen in der Genbank identifiziert und nachfolgend isoliert.

Überraschend wurde im Rahmen der Erfindung gefunden, daß durch eine modifizierte Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Veränderung bestimmter Reaktionsparameter natürlich vorkommende Hydrolasen gene derart mutagenisiert werden können, daß eine umfangreiche Mutantenbibliothek erhalten wird, die mit Hilfe eines neuartigen Testverfahrens nach Mutanten mit verbesserter Enantioselektivität durchsucht werden kann.

Die Neuartigkeit des Verfahrens besteht darin, daß ausgehend von einem natürlich vorkommenden Lipase- bzw. Esterase-Gen (dem sogenannten Wildtyp-Gen) unter Verwendung einer modifizierten PCR (im folgenden als *mutagenisierende PCR* bezeichnet) eine umfangreiche, randomisierte Mutantenbibliothek angelegt werden kann. Dabei wurde gefunden, daß durch Veränderung der PCR-Reaktionskomponenten die Mutationsfrequenz während der PCR gezielt eingestellt werden kann. Durch die Variation der Mg²⁺- und/oder der Desoxynucleotid-Konzentrationen und/oder der Zugabe von Mn²⁺-Ionen läßt sich die Anzahl der Mutationen im betrachteten Lipase-Gen (Mutationsfrequenz) steuern. Vorzugsweise werden hierzu folgende Konzentrationen in Abhängigkeit der verwendeten DNA-Polymerase benutzt:

Mg²⁺ : 1,5 mM - 8,0 mM

dNTP : 0,05 mM - 1,0 mM

Mn²⁺ : 0,0 mM - 3,0 mM

Außerdem wurde gefunden, daß die Zyklenzahl der PCR-Reaktion mit der Anzahl der Mutationen korreliert: je höher die Zyklenzahl gewählt wird, desto höher die Gesamtanzahl der Mutationen. Mit Hilfe dieses Parameters läßt sich die Diversität der Mutantenbibliothek einstellen.

Zur Bestimmung der Mutationsfrequenz werden die aufgereinigten PCR-Produkte sequenziert. Durch Vergleich der erhaltenen Sequenzen mit der Sequenz des Wildtyp-Gens läßt sich die Mutationsfrequenz bestimmen.

Tabelle 1 zeigt die Abhängigkeit der Mutationsfrequenz von der Konzentration obengenannter PCR-Reaktionskomponenten bei der Amplifizierung des Lipase-Gens aus *P. aeruginosa* (*lipA*).

Tabelle 1

Versuch	Mg ²⁺ (mM)	Mn ²⁺ (mM)	dATP/ dGTP (mM)	dTTP/ dCTP (mM)	Mutations- frequenz (Mutationen /1000 bp ¹⁾)
1	6,1	-	0,2	0,2	1-2
2	7,0	0,5	0,2	1,0	15-20

¹⁾bp = Basenpaare

Aufgrund der Resultate der Sequenzierung ergibt sich weiterhin, daß als Mutationsarten Transitionen und Transversionen statistisch in etwa gleicher Häufigkeit auftreten. Deletionen und Insertionen werden hingegen nur selten beobachtet. Zudem liegen die Mutationen über das ganze Lipase-Gen gleich verteilt vor. Somit läßt sich mit der beschriebenen Methode eine Mutantenbank mit statistisch gleichverteilten Mutationen erzeugen. Als vorteilhaft hat sich eine Mutationsfrequenz von 1-2 Mutationen / Hydrolasegen erwiesen. Dadurch wird verhindert, daß beim Auftreten mehrerer Mutationen pro Hydrolasegen eine negative Mutation eine Mutation mit positivem Effekt maskiert. Um eine komplette Mutantenbibliothek mit jeweils einem Aminosäureaustausch pro Enzymmolekül zu erhalten, müssen bei einer Lipase, die aus 285 Aminosäuren (hier: Lipase aus *P. aeruginosa*) besteht, theoretisch 5415 Mutanten erzeugt werden. Dieser Wert ergibt sich gemäß folgendem Algorithmus:

$$N = 19 \times M \times 285! / [(285 - M)! \times M!]$$

mit N = Anzahl der Mutanten und M = Anzahl der Aminosäure-Austausche pro Lipase-Molekül. Im Rahmen der Erfindung konnte überraschend gezeigt werden, daß bereits bei weitaus geringeren Bibliotheksgrößen positive Mutanten gefunden werden, wobei mit einer Mutationsfrequenz von 1-2 gearbeitet wurde.

Die nach dem beschriebenen Verfahren erhaltenen mutierten Lipase- bzw. Esterase-Gene werden in einen geeigneten Expressionsvektor ligiert und dann nach einem Wirtsorganismus, z.B. *E. coli*, transformiert. Anschließend werden die transformierten Zellen auf Agarplatten ausgestrichen und kultiviert. Sofern eine genügend hohe Expressionsrate vorliegt, können die erhaltenen Kolonien in mit Flüssigmedium versehene Mikrotiterplatten überführt werden und nach dem Anwachsen direkt zum Screeningtest eingesetzt werden. Für den Fall, daß bei der Expression des Lipasegens nur wenig Enzym gebildet wird, bzw. das Genprodukt im verwendeten Wirtsorganismus nicht korrekt gefaltet (Inklusionskörper) oder unvollständig in das Kulturmedium sekretiert wird, ist es vorteilhaft, die mutierten Gene in einen anderen Wirtsorganismus, vorzugsweise den Ursprungsorganismus, umzuklonieren.

Um genügend hohe Enzymaktivitäten zu erhalten, werden die einzelnen Bakterienklone, die ein mutiertes Lipase- bzw. Esterase-Gen enthalten, von den Agarplatten in die Tröge von handelsüblichen Mikrotiterplatten überführt und dort in Flüssigmedium angezogen. Vorzugsweise werden hierfür Mikrotiterplatten mit 96 Trögen pro Platte benutzt. Das Wachstum der Bakterien kann durch Messung der Zelldichte (OD₆₀₀-Wert) kontrolliert werden. Es ist vorteilhaft, parallel eine zweite Mikrotiterplatte auf diese Weise anzuimpfen, um so eine Referenz für die spätere Identifizierung positiver Klone zu haben. Diese wird zweckmäßigerweise nach dem Anwachsen der Bakterien mit Glycerin versetzt und bis zur Identifizierung bei -80°C gelagert. Sofern die Bakterien das Enzym in den Extrazellularraum sekretieren (z.B. bei der Lipase aus *P. aeruginosa*), werden die Zellen in den Mikrotiterplatten abzentrifugiert und der Überstand mit der Lipase- bzw. Esterase-Aktivität zum Screeningtest eingesetzt. Für den Fall, daß die Bakterien (z.B. *E. coli*) das Enzym in das Periplasma sezernieren, muß vorher eine Zellwand-Lyse durchgeführt werden, wobei literaturbekannte Methoden wie z.B. eine Lysozym-Behandlung angewendet werden können.

Durch Anzucht der zugehörigen Klone von der Referenzplatte läßt sich ausreichend Plasmid-DNA isolieren, die zur Charakterisierung des

mutierten Lipase- bzw. Esterase-Gens eingesetzt werden kann. Durch Sequenzierung werden die Mutationen im Gen lokalisiert. Ein Vorteil der Erfindung betrifft die Tatsache, daß auch ohne Kenntnisse der exakten Position der Mutationen in einem positiven Klon, das mutierte Gen in weiteren Mutations-Zyklen nach dem beschriebenen Verfahren hinsichtlich seiner Eigenschaften weiter optimiert werden kann. Dazu wird das isolierte Lipase- bzw. Esterase-Gen erneut in einer nach den oben angegebenen Bedingungen modifizierten PCR (*mutagenisierende PCR*) eingesetzt. Diese Prozedur kann so oft wiederholt werden, bis die Eigenschaften der Lipase- bzw. Esterase-Mutante den Anforderungen an die stereoselektive Umsetzung genügen.

Zur weiteren Optimierung der identifizierten positiven Mutanten läßt sich das beschriebene Verfahren dergestalt erweitern, daß die DNA mehrerer Positiv-Mutanten zunächst fragmentiert wird und dann in einem kombinatorischen Prozeß nach W.P.C. Stemmer (*Nature*, 1994, 370, 389) zu funktionalen Lipase- bzw. Esterase-Genen reassembliert werden kann. Die so erhaltene *in vitro*-Rekombinantenbibliothek wird anschließend exprimiert und die rekombinanten Genprodukte mit Hilfe der erfindungsgemäßen Testverfahren auf verbesserte Enantioselektivität hin untersucht. Der Vorteil dieses Verfahrens besteht darin, daß sich aufgrund der Rekombination die positiven Eigenschaften verschiedener Lipase- bzw. Esterase-Mutanten in einem neuen rekombinanten Gen addieren können, was letztlich zu einer weiteren Verbesserung der Lipase bzw. Esterase führen kann. Der Ablauf des beschriebenen Verfahrens ist wie folgt:

Die Lipase- bzw. Esterase-Gene werden zunächst mit Hilfe des Enzyms DNase I (z.B. aus Rinder-Pankreas) in Fragmente gespalten mit einer vorzugsweise Länge zwischen 25 Bp und 100 Bp. Die Größe der Fragmente läßt sich durch Auf trennung mittels einer Agarose-Gelelektrophorese und Vergleich mit entsprechenden DNA-Längenmarkern kontrollieren. Die so erhaltenen DNA-Fragmente werden aufgereinigt, um sie von anhaftender DNase zu befreien. Die *in vitro*-Rekombination wird unter den Bedingungen einer konventionellen PCR

durchgeführt, wobei keine PCR-Primer zugesetzt werden. Analog zur konventionellen PCR unterteilt sich ein Zyklus in drei Schritte: a) Denaturierung, b) Annealing und c) Elongation. Während des Annealings kommt es zu einer Hybridisierung sequenzhomologer Fragmente, die aus unterschiedlichen mutierten Lipase- bzw. Esterase-Genen stammen können. Im nachfolgenden Elongationsschritt werden die Strände durch die DNA-Polymerase vervollständigt, so daß schließlich neue, rekombinante Lipasegene erhalten werden. Die optimale Anzahl der Zyklen wird in einem Vorversuch bestimmt. Dazu trennt man nach jeweils 5 Zyklen eine geringe Probe des Reaktionsansatzes mittels Agarose-Gelektrophorese auf und ermittelt daraus den Zyklus, bei dem das Maximum der Größenverteilung der Rekombinanten im Bereich der Größe des Enzym-Gens liegt. Vorzugsweise wird eine Zyklenzahl zwischen 30 und 45 gewählt. Die erhaltene Bande im Agarosegel, die der Größe nach dem Lipase- bzw. Esterase-Gen entspricht, wird aufgereinigt und durch eine konventionelle PCR amplifiziert. Das PCR-Produkt wird aufgereinigt und nach Ligation in einen geeigneten Vektor (Plasmid) nach *E. coli* transformiert. Wie bereits im Abschnitt über die *mutagenisierende PCR* besprochen, kann es erforderlich sein, in einen anderen Wirtsorganismus umzuklonieren, falls die Lipaseaktivität nach der Expression in *E. coli* zu gering sein sollte. Die erhaltenen Rekombinanten werden für den Test auf Enantioselektivität in Mikrotiterplatten angezogen.

In einer Variante der Erfindung können die beschriebenen Verfahren der *mutagenisierenden PCR* und der *in vitro*-Rekombination zur Erzeugung von Mutations- bzw. Rekombinantenbibliotheken nacheinander in beliebiger Reihenfolge und Häufigkeit durchgeführt bzw. wiederholt werden, um die Enantioselektivität der Lipase bzw. Esterase zu optimieren. Vorzugsweise wird zu Beginn mindestens ein Mutationszyklus mittels *mutagenisierender PCR* durchgeführt. Im Anschluß daran kann dann ein *in vitro*-Rekombinations-Zyklus erfolgen, wobei die jeweils besten positiven Mutantenklone eingesetzt werden. Durch Kontrolle der Enantioselektivität der erhaltenen Enzym-Mutanten läßt sich der Optimierungsprozeß verfolgen.

In einer weiteren Variante der Erfindung können positive Lipase- bzw. Esterase-Mutanten, die durch das Screening von Mutanten- oder Rekombinantenbibliotheken identifiziert wurden, mit Hilfe der klassischen gerichteten Mutagenese bzw. der Kassetten-Mutagenese weiter optimiert werden. Dazu wird die Mutation in dem Lipase- bzw. Esterase-Gen zunächst durch Sequenzierung lokalisiert. Anschließend wird dieses Gen mit Hilfe "gewobbelter" Primer an den Codons, die für positive Mutanten codieren, erneut mutagenisiert. Die so erhaltene begrenzt große Mutantenbibliothek kann dann exprimiert werden und nach verbesserter Enantioselektivität gescreent werden.

In einer Variante des beschriebenen Verfahrens wird das Lipase- bzw. Esterase-Gen des Wildtyp-Enzyms zusammen mit den gefundenen Positiv-Mutanten zur *in vitro*-Rekombination eingesetzt. Dadurch kann es zu Rückkreuzungen kommen, bei denen Mutationen mit neutralen oder negativen Eigenschaften eliminiert werden können. Die erhaltene Rekombinantenbibliothek kann nach der Expression auf verbesserte Enantioselektivität untersucht werden.

In einer weiteren Variante des beschriebenen Verfahrens werden Hydrolasegene aus unterschiedlichen Organismen zur *in vitro*-Rekombination eingesetzt, sofern sie eine genügende Sequenzhomologie zu dem ursprünglich eingesetzten Hydrolasegenen besitzen.

In einer Variante des Verfahrens wird die *in vitro*-Rekombination unter den Bedingungen der beschriebenen modifizierten PCR durchgeführt. Dazu wird die Konzentration der Mg²⁺- bzw. Mn²⁺-Ionen sowie die der Desoxynucleotide (dNTPs) verändert, um gezielt die Mutationsfrequenz während der *in vitro*-Rekombination zu einzustellen.

Gegenstand der Erfindung sind weiterhin Testverfahren, die die Identifizierung von Enzym-Mutanten mit verbesserter Stereoselektivität oder Regioselektivität aus umfangreichen Mutantenbibliotheken ermöglichen. Dazu werden zwei gleiche Aliquots des enzymhaltigen Überstandes nach der Zentrifugation der Bakterienzellen in jeweils

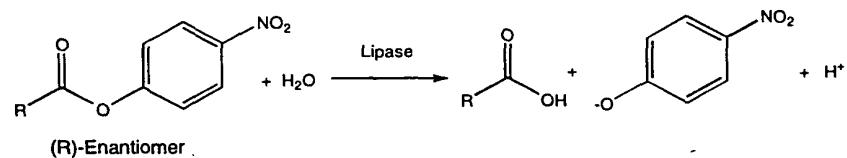
benachbarte Tröge einer neuen Mikrotiterplatte überführt. Nach Zugabe der beiden enantiomeren Substrate in jeweils einen der Tröge wird die Aktivität der Lipase bzw. Esterase spektrophotometrisch bestimmt. Die Messungen werden in einem handelsüblichen Spektralphotometer für Mikrotiterplatten durchgeführt. Dadurch wird ein hoher Probendurchsatz ermöglicht. Die Wahl des Substrates richtet sich nach der Art der chiralen Verbindung, für die eine Optimierung der Lipase bzw. Esterase vorgenommen werden soll. Insbesondere eignet sich das Verfahren für chirale Carbonsäuren, Alkohole und Amine.

Im Fall von chiralen Carbonsäuren bzw. chiralen COOH-funktionalisierten Verbindungen werden die beiden entsprechenden p-Nitrophenylester der (R)- bzw. (S)-Säure als Testsubstrat eingesetzt. Formel 1 zeigt das Prinzip des Testverfahrens, wobei R einen beliebigen organischen Rest mit mindestens einem asymmetrischen Zentrum symbolisiert.

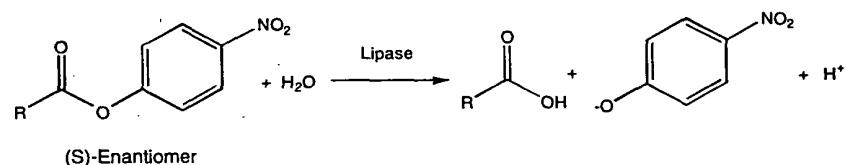
Formel 1

Schema für das Testverfahren auf Stereoselektivität bei chiralen Carbonsäuren bzw. COOH-funktionalisierten Verbindungen

Reaktion 1:



Reaktion 2:



Aufgrund der hohen Extinktion des bei der Hydrolase-katalysierten Esterhydrolyse freigesetzten p-Nitrophenolat-Anions ($\lambda_{\max}=405$ nm,

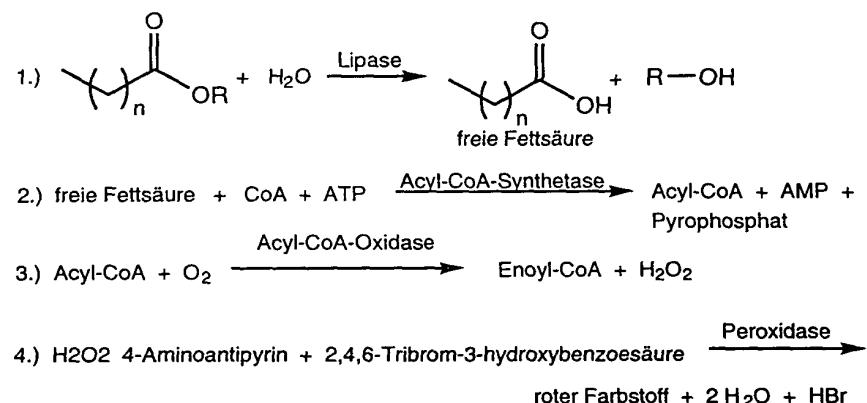
$E_{max}=14.000$) ergibt sich ein hochempfindliches Testverfahren, mit dem eine Aktivitätsbestimmung auch bei niedrigen Substratkonzentrationen durchgeführt werden kann. Die Enantioselektivität der Hydrolase-Mutanten läßt sich aus dem Quotienten der Hydrolysegeschwindigkeiten $V_{app(R)}$ und $V_{app(S)}$ für den (R)- und den (S)-Ester mit ausreichender Genauigkeit bestimmen. Da die beiden Testansätze jeweils nur ein Enantiomer enthalten (entweder den R- oder S-Ester), muß bei der Bestimmung der Enantioselektivität die fehlende Konkurrenzreaktion mit dem anderen Enantiomer berücksichtigt werden. Dieser kinetische Effekt kann zwar zur Berechnung fehlerbehafteter Enantioselektivitäten führen, es hat sich jedoch gezeigt, daß die nach der vorgestellten Methode erhaltenen apparenten Enantioselektivitäten (E_{app}) genügend Aussagekraft hinsichtlich der Enantioselektivität der mutierten Lipasen haben. E_{app} ergibt sich als $V_{app(R)} / V_{app(S)}$. Ein weiterer Vorteil liegt in der einfachen Durchführung und guten Reproduzierbarkeit des Tests, der sich auch für ein Screening mit hohem Probendurchsatz eignet.

Im Fall von chiralen Alkoholen bzw. von chiralen OH-funktionalisierten Verbindungen werden Fettsäureester der beiden enantiomerenreinen Alkohole für den Test auf Stereoselektivität eingesetzt. Die Kettenlänge der Fettsäuren liegt im Bereich von C₂ bis. Als Alkohol-Komponente können primäre, sekundäre und tertiäre Alkohole sowie deren Derivate mit mindestens einem Asymmetriezentrum eingesetzt werden. Lösungen der Ester der (R)- und (S)-Alkohole werden in jeweils benachbarten Trögen einer Mikrotiterplatte mit Kulturüberständen der Hydrolase-Mutanten hydrolysiert. Die Hydrolysegeschwindigkeiten $V_{app(R)}$ und $V_{app(S)}$ der (R)- und (S)-Ester sind ein Maß für die Enantioselektivität der untersuchten Enzym-Mutante. Die Detektion erfolgt über eine gekoppelte Enzymreaktion (H.U. Bergmeyer, *Grundlagen der enzymatischen Analyse*, Verlag Chemie, Weinheim, 1977), bei der die kontinuierliche Freisetzung der Fettsäure verfolgt wird. Der gebildete Farbstoff wird colorimetrisch bei 546 nm ($\epsilon = 19,3 \text{ l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) bestimmt. Die Konzentrationen der Enzyme, Cofaktoren und Coenzyme der Hilfsreaktionen 2 und 3 (siehe Formel 2) sowie der Indikatorreaktion 4 müssen so gewählt werden, daß die zu bestimmende Lipase- bzw.

Esterase-katalysierte Reaktion geschwindigkeitsbestimmend ist. Der Quotient der Hydrolysegeschwindigkeiten des (R)- und (S)-Esters entspricht der apparenten Enantioselektivität (E_{app}). In einer Variante werden anstelle der enantiomerenreinen Ester die Fettsäureamide chiraler Amine bzw. NH₂- oder NHR-funktionalisierter Verbindungen eingesetzt. Formel 2 zeigt das Schema des Testsystems.

Formel 2

Schema für das Testverfahren auf Stereoselektivität bei chiralen Alkoholen; R symbolisiert einen beliebigen organischen Rest mit mindestens einem asymmetrischen Zentrum; Abkürzungen: CoA (Coenzym A), ATP (Adenosin-5'-triphosphat), AMP (Adenosin-5'-monophosphat)

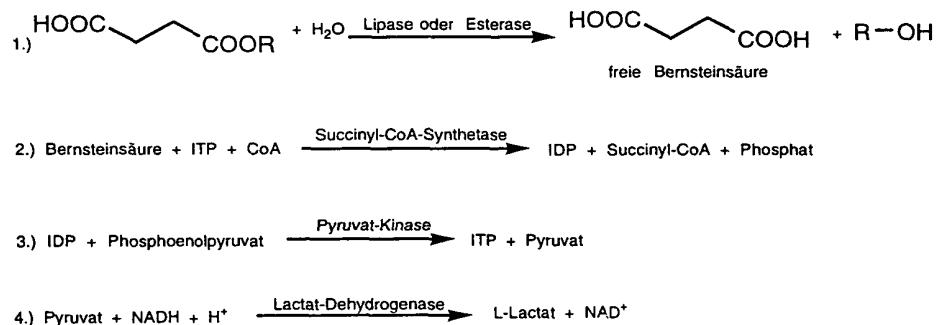


In einer Variante des Verfahrens können anstelle der Fettsäureester bzw. -amide die entsprechenden Ester und Amide der Bernsteinsäure eingesetzt werden. Diese haben gegenüber den Fettsäuren den Vorteil der besseren Löslichkeit in wäßrigen Lösungen bzw. wäßrig-organischen Solventien. Die Messung erfolgt UV-spektrometrisch bei 340 nm ($\epsilon = 6,3 \cdot 10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Auch bei diesem Testverfahren ist zu beachten, daß die Hydrolase-katalysierte Reaktion 1 geschwindigkeitsbestimmend ist. Der Quotient der Hydrolysegeschwindigkeiten $V_{app(R)}$ und $V_{app(S)}$ des (R)- und (S)-Esters entspricht der apparenten Enantioselektivität (E_{app}). In einer Variante werden anstelle der enantiomerenreinen Ester die Fettsäureamide chiraler Amine eingesetzt. Als Amin-Komponente können

sowohl primäre als auch sekundäre Amine eingesetzt werden. Das Schema des Testverfahrens ist in Formel 3 wiedergegeben.

Formel 3

Schema für das Testverfahren auf Stereoselektivität bei chiralen Alkoholen; R symbolisiert einen beliebigen organischen Rest mit mindestens einem asymmetrischen Zentrum; Abkürzungen: CoA (Coenzym A), ITP (Inosin-5'-triphosphat), IDP (Inosin-5'-diphosphat), NADH / NAD⁺ (reduziertes bzw. oxidiertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid)



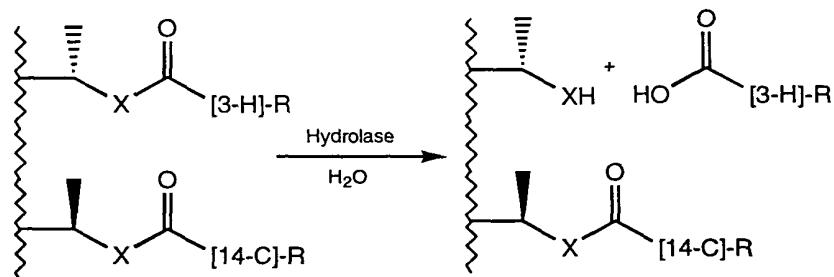
Der Test zur Identifizierung von Hydrolase-Mutanten mit verbesserter Stereoselektivität kann weiterhin derart ausgeführt werden, daß beide Stereoisomere im Testansatz enthalten sind. Dadurch kann auf die getrennte Messung des (R)- und (S)-Enantiomers verzichtet werden. Das Testprinzip geht von einer Anbindung eines racemischen Gemisches des chiralen Substrates an einer Festphase aus. Über eine Ester- bzw. Amidbindung an dieser chiralen Verbindung wird ein radioaktiv markierter organischer Rest gebunden. Zwei Fälle lassen sich unterscheiden:

- Festphasen-gebundene chirale Carbonsäure: die Carboxylfunktion wird mit einem radioaktiv markierten Alkohol verestert
- Festphasen-gebundener chiraler Alkohol oder chirales Amin, bzw. OH- oder NH₂- (NHR-)funktionalisierte Verbindungen: die Hydroxyl- bzw. Aminfunktion wird mit einer radioaktiv markierten Carbonsäure markiert.

Entscheidend ist dabei, daß die beiden Enantiomeren des an der Festphase gebundenen racemischen Gemisches mit unterschiedlichen Isotopen markiert sind. Vorzugsweise werden ^3H und ^{14}C -markierte Verbindungen eingesetzt. Als Festphase können sowohl alle gängigen organischen, funktionalisierten Polymere sowie anorganische, funktionalisierte Träger eingesetzt werden. Vorzugsweise werden Festphasen auf Polystyrol-Basis und Kieselgel-Träger eingesetzt. Anschließend werden die chiralen, radioaktiv markierten Verbindungen an die Festphase gebunden, wobei die Kupplung an die Festphase an die chemische Beschaffenheit des chiralen Substrates angepaßt werden muß. Formel 4 zeigt das Schema der modifizierten Festphase und das Prinzip des Testverfahrens.

Formel 4

Schema des Festphasen-Screeningtests auf Stereoselektivität mit doppelt radioaktiv markiertem Sustrat; ($\text{X} = \text{O}, \text{NH}$; R ist ein radioaktiv markierter, organischer Rest)



Etwa gleiche Mengen des so modifizierten Trägers können in kleine Reaktionsgefäße verteilt werden (z.B. in die Tröge von Mikrotiterplatten) und dann mit den Kulturüberständen der Hydrolase-Mutanten versetzt werden. Bei der anschließenden Reaktion werden die radioaktiv markierten Komponenten (Carbonsäure oder Alkohol) von der Festphase hydrolysiert und in das flüssige Medium abgegeben. Ein Aliquot des Mediums wird dann entnommen und in einem Szintillationsmeßgerät auf die Menge an Radioaktivität hin untersucht. Aus dem Verhältnis der beiden unterschiedlichen Isotope zueinander kann der Enantiomerenüberschuß und der Umsatz der Reaktion und somit die Stereoselektivität der

mutierten Esterase bzw. Lipase berechnet werden. Durch Verwendung von regioisomeren Testverbindungen lassen sich die beschriebenen Tests auch zur Identifizierung von Hydrolase-Mutanten mit verbesserter Regioselektivität einsetzen. Anstelle von Hydrolase-Mutanten können auch andere Katalysatoren eingesetzt werden, um die Stereo- oder Regioselektivität zu bestimmen.

Der Test auf Enantioselektivität der nach dem beschriebenen Verfahren hergestellten Hydrolase-Mutanten kann auch durch kapillarelektrophoretische Trennung erfolgen unter Verwendung von chiral modifizierten Kapillaren, die eine direkte Trennung der enantiomeren Substrate bzw. Produkte der Hydrolase-katalysierten Testreaktion ermöglichen. Hierzu können die Testsubstrate als Racemat eingesetzt werden. Die Trennung kann sowohl in Kapillaren erfolgen als auch unter Verwendung von präparierten Mikrochips, die eine elektrophoretische Trennung und Parallelisierung der Analysen zum Zwecke eines hohen Probendurchsatzes ermöglichen. Voraussetzung ist in beiden Fällen, daß die Enantiomeren kapillarelektrophoretisch trennbar sind.

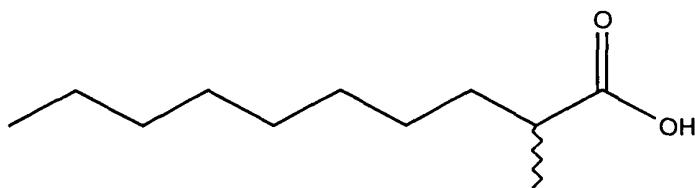
Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele und Figuren näher erläutert.

Fig. 1 zeigt die experimentell erhaltenen Meßkurven zur Bestimmung der apparenten Enantioselektivität (E_{app}) bei der Hydrolyse von R)- bzw. (S)-2-Methyldecansäure-p-nitrophenylester mit Kulturüberständen der Lipase-Mutanten P1B01-E4, P2B08-H3, P3B13-D10 und der Wildtyp-Lipase aus *P. aeruginosa* (die Steigerungen haben die Einheit [mOD/min]).

Fig. 2: Vergleich der DNA-Sequenzen der Lipase-Mutanten P1B01-H1, P1B01-E4, P2B08-H3 und P3B13-D10 mit der Sequenz des Wildtyps (wt) von Lipase aus *P. aeruginosa* (die mutierten Basen relativ zum Wildtyp sind schwarz unterlegt, der Start der reifen Lipase-Mutanten liegt bei AS 163).

Beispiel 1

Im folgenden Beispiel wurde das Gen der Lipase aus *P. aeruginosa* (Isolierung nach K.-E. Jäger, Ruhr-Universität Bochum) für eine Optimierung herangezogen. Das Substrat, auf das hin die Enantioselektivität der Lipase verbessert werden sollte, war (*R,S*)-2-Methyldecansäure. Es sollte eine Lipase-Mutante entwickelt werden mit einer Präferenz für das (*S*)-Enantiomer. Der Screening-Test wurde mit (*R*)- bzw. (*S*)-2-Methyl-decansäure-p-nitrophenylester durchgeführt.

Formel 5

(R,S)-2-Methyldecansäure

Bakterienstämme

E. coli JM109:

e14-(McrA), recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17(rK-mK+), supE44, relA1, Δ(lac-proAB), [F' traΔ36 proAB lacIq ZΔM15]
(Fa. Stratagene)

P. aeruginosa PABST7.1:

lacUV5/laci^q reguliertes T7-Polymerasegen stabil in das Chromosom des Stamm *P. aeruginosa* PABS integriert, der eine Deletion im Strukturgen der Lipase *lipA* trägt (K.-E. Jaeger et al. *J. Mol. Cat. Part B*, 1997, in press)

Plasmide

pMut5: *BamHI/ApaI* Fragment (1046 Bp) des *P. aeruginosa* Lipasegens *lipA* im Vektor pBluescript KSII (Fa. Stratagene)

pUCPL6A: *BamHI/HindIII* Fragment (2,8 KBp), welches das *P. aeruginosa* Lipase-Operon umfaßt, im Vektor pUCPKS (Watson et al., Gene 1996, 172, 163) unter der Kontrolle des T7-Promotors

Kultivierung von Bakterien

E. coli JM109 wird über Nacht (16h) bei 37°C in 5 ml LB Medium auf einem Reagenzglasroller angezogen. Für *P. aeruginosa* PABST7.1 wird dem Medium 1mM IPTG zugesetzt. Für den Screening-Test wird *P. aeruginosa* PABST7.1 in Mikrotiterplatten auf einem Rundschüttler angezogen, wobei das Kulturvolumen 200 µl beträgt und die Inkubation auf 36-48h verlängert wird. Antibiotika werden in folgenden Konzentrationen zugegeben:

E.coli JM109: Ampicillin 100 µg/ml; *P.aeruginosa* PABST7.1: Carbenicillin 200 µg/ml, Tetrazyklin 50 µg/ml

Mutagenisierende PCR

Das Lipasegen *lipA* wird unter Verwendung des durch Endonuclease *Xmn* I linearisierten Plasmids pMut5 als Matrize und folgender PCR-Primer amplifiziert:

A :5'-GCGCAATTAAACCCCTCACTAAAGGGAACAAA-3';
B :5'-GCGTAATACGACTCACTATAAGGGCGAA-3'

Nach Reinigung des PCR-Produktes mittels einer Qiagen Qiaquick Column® dient es als Template in einer mutagenen PCR-Reaktion. Die Reaktionsbedingungen sind wie folgt: ein 100 µl Reaktionsvolumen

enthält 16,6 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 67 mM Tris-HCl (pH 8.8); 6,1 mM MgCl_2 ; 6,7 μM EDTA (pH 8.0); 0,2 mM dNTPs; 10 mM Mercaptoethanol; 10 μl DMSO; je 10 pmol der Primer; 0,1 ng Template-DNA und 1U Taq-Polymerase (Goldstar, Fa. Eurogentec). Das Reaktionsvolumen wird mit 100 μl Paraffin überschichtet. Es wurden 10 parallele Reaktionen durchgeführt, die nach Reaktionsende vereinigt wurden. Das Zyklen-Protokol ist wie folgt: Nach einer 2 min Denaturierung bei 98°C, folgen 25 Zyklen mit 1 min 94°C, 2 min 64°C 1 min 72°C auf einem Robocycler 40 (Fa. Stratagene), gefolgt von einer 7 min Inkubation bei 72°C. Die Taq-Polymerase wird nach der Denaturierung des 1. Zyklus zugesetzt. Die Sequenzierung der PCR-Produkte ergibt eine Fehlerrate von ca. 1-2 Basenaustauschen pro 1000 Bp.

Klonierung der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte werden mit Ethanol gefällt und in A. dest resuspendiert. Nach Restriktion mit *Apal* und *BamHI* wird das entstandene 1046 Bp Fragment mittels einer Qiagen Qiaquick Column® gereinigt und unter Verwendung von T4-DNA Ligase (Fa. MBI Fermentas) für 2h bei RT in den entsprechend vorbereiteten Vektor pUCPL6A ligiert. Das Reaktionsvolumen wird 1:5 verdünnt und in 200 μl kompetenter Zellen von *E. coli* JM109, die nach der Methode von *Hanahan* (*J. Mol. Biol.* 1983, 166, 557) präpariert werden, transformiert. Dazu werden DNA und Zellen für 1h auf Eis gelagert, 2 min bei 42°C und nach Zugabe von 700 μl LB-Medium 45 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Zellsuspension wird anschließend auf LB (Ampicillin 100 $\mu\text{g/ml}$) Platten ausplattiert. 60 ng des PCR-Produktes, die in die Liganisationsreaktion eingesetzt werden, erbringen ca. 1500 Kolonien. Alle Kolonien werden in sterilem LB-Medium resuspendiert, die Plasmid DNA gereinigt und durch Elektroporation nach der Methode von *Farinha* und *Kropinski* (*FEMS Microbiol. Lett.* 1990, 70, 221) in *P. aeruginosa* PABST7.1 transformiert. Die 96 Tröge der Mikrotiterplatten werden mit jeweils einer Kolonie inokuliert und wie im Abschnitt "Kultivierung von Bakterien" beschrieben behandelt. Zur Gewinnung des Kulturüberstandes, der anschließend im

Test auf Stereoselektivität eingesetzt wird, werden die Mikrotiterplatten 30 min bei 4000 Upm zentrifugiert.

Test auf Stereoselektivität

Die durch Zentrifugation gewonnenen Lipase-haltigen Kulturüberstände werden in jeweils zwei gleichen Aliquots in benachbarte Tröge einer Mikrotiterplatte pipettiert. Das Testvolumen beträgt 100 µl und setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen (Tabelle 2):

Tabelle 2

Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für den Test auf verbesserte Enantioselektivität von Lipase-Mutanten

(R)-Ansatz	(S)-Ansatz
50 µl Kulturüberstand	50 µl Kulturüberstand
40 µl 10 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7,5	40 µl 10 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7,5
10 µl Substratlösung [10 mg / ml (R)-2-Methyldecansäure-p-nitrophenylester in DMF]	10 µl Substratlösung [10 mg / ml (S)-2-Methyldecansäure-p-nitrophenylester in DMF]

Nach der Zugabe des Tris/HCl-Puffers zu den Überständen wird die Mikrotiterplatte ca. 5 min bei 30 °C inkubiert. Die Reaktion wird nach Addition der Substratlösung spektrophotometrisch bei 410 nm und 30 °C kontinuierlich 10 min lang verfolgt. Aus dem linearen Anstieg der Absorptionskurve, die ein Maß für die konstante Anfangsgeschwindigkeit der Hydrolyse ist, wird die apparente Enantioselektivität (E_{app}) bestimmt. Dazu werden die gemessenen Steigungen im linearen Bereich der Anfangsgeschwindigkeiten der Reaktionen des Enantiomerenpaars dividiert und man erhält den Wert für die apparente Enantioselektivität der entsprechenden Lipase-Mutante.

Bestimmung der Stereoselektivität durch Gaschromatographie

Ausgewählte positive Klone werden in 5 ml -Flüssigkulturen (LB-Medium) angezogen und der Lipase-haltige Überstand nach Zentrifugation und Entfernung des Bakterien-Pellets zur Reaktion eingesetzt. Als Substrat werden 100 µl einer Lösung von racemischem (*R,S*)-2-Methyldecansäure-p-nitrophenylester (10 mg/ml in Dimethylformamid) eingesetzt. Diese wird mit 700 µl 10 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,5 versetzt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 100 µl Kulturüberstand gestartet und bei 30°C und 1000 rpm in Eppendorf-Reaktionsgefäßchen durchgeführt. Nach 2,5 h werden jeweils 200 µl Proben entnommen und in ein mit 200 µl Dichlormethan gefülltes Eppendorf-Gefäß überführt. Nach Zugabe von 25 µl 20 %iger Salzsäure werden Produkte und Edukt extrahiert (Vortex-Schüttler, 1 min). Die organische Phase wird schließlich zur gaschromatographischen Analyse (GC) eingesetzt. Dabei wird eine Trennung der Enantiomere der freien 2-Methyldecansäure erzielt.

Trennbedingungen der GC:

Instrument:	Hewlett Packard 5890
Säule:	25 m 2,6 DM 3 Pent β-CD / 80% SE 54
Detector:	FID
Temperatur:	230°C Inlet; 80-190°C mit 2°C / min
Gas:	0,6 bar H ₂
Probenmenge:	0,1 ml

Ergebnisse (1. Zyklus)

Von ca. 1000 untersuchten Klonen, die durch *mutagenisierende PCR* mit der Ausgangs-DNA (Wildtyp-Gen von Lipase aus *P. aeruginosa*) erhalten wurden, wurden 12 mit verbesserter Enantioselektivität gegenüber dem entsprechenden Wildtyp-Enzym identifiziert. 3 Klone wurden schließlich ausgewählt und deren Enantioselektivität durch GC-Analyse bestimmt.

Tabelle 3

Ausgewählte Lipase-Mutanten mit verbesserter Enantioselektivität
(1. Zyklus)

Mutante	$V_{app}(S)$ [mOD/min]	$V_{app}(R)$ [mOD/min]	E_{app} ¹⁾	% ee (nachGC) /% Umsatz	E-Wert ²⁾ (berechnet nach GC)
Wildtyp	21,8	14,9	1,5	2,4 / 15,3	1,1
P1B01-E4	128,4	43,2	3,0	36,1 / 23,2	2,4
P1B01-F12	78,8	35,7	2,2	14,1 / 30,5	1,4
P1B01-H1	158,7	56,2	2,8	37,6 / 4,5	2,2

¹⁾ $E_{app} = V_{app}(S) / V_{app}(R)$

²⁾ $E = \ln[1-c(1+ee_p)] / \ln[1-c(1-ee_p)]$ mit c = Umsatz, ee_p = ee-Wert des Produktes

Die DNA des Klons P1B01-E4 diente als Ausgangspunkt für eine neue PCR-Mutagenisierungsrounde. Dazu wurde das Plasmid pUCPL6A aus dem Klon isoliert und wie oben beschrieben nach *E. coli* JM109 transformiert. Nach Präparation der Plasmid-DNA wurde das 1046 Bp große Fragment durch Restriktion mit *Apal* und *BamHII* und anschließender Reinigung gewonnen und in das entsprechend vorbereitete Plasmid pMut5 ligiert. Nach Transformation und Plasmidisolierung diente dieses Plasmid als template-DNA in einer *mutagenisierenden PCR*-Reaktion unter den oben beschriebenen Bedingungen. Die gewonnene DNA der *mutagenisierenden PCR* diente zur Herstellung einer neuen Mutantenbibliothek (2. Generation).

Ergebnisse (2. Zyklus)

Aus der Mutantenbibliothek der 2. Generation wurden ca. 2200 Klone zum Screening-Test herangezogen. Dabei wurden 10 Mutanten mit einer gegenüber der Mutante P1B01-E4 verbesserten Enantioselektivität identifiziert. 2 Mutanten (P2B04-G11 und P2B08-H3) wurden per GC-Analyse genauer untersucht.

Tabelle 4

Ausgewählte Lipase-Mutanten mit verbesserter Enantioselektivität
(2. Zyklus)

Mutante	V _{app} (S) [mOD/min]	V _{app} (R) [mOD/min]	E _{app} ¹⁾	% ee (nachGC) / % Umsatz	E-Wert ²⁾ (berechnet nach GC)
P2B04-G11	224,9	52,3	4,3	47,8 / 30,0	3,4
P2B08-H3	310,8	67,4	4,6	56,6 / 19,3	4,1

1) $E_{app} = V_{app}(S) / V_{app}(R)$

2) $E = \ln[1-c(1+ee_p)] / \ln[1-c(1-ee_p)]$ mit c = Umsatz, ee_p = ee-Wert des Produktes

Der Klon P2B08-H3 wurde für die nächste Mutationsrunde (3. Generation) eingesetzt.

Ergebnisse (3. Zyklus)

Aus der Mutantenbibliothek der 3. Generation wurden ca. 2400 Klone zum Screening-Test herangezogen. Dabei wurde 1 Mutante (P3B13-D10) mit einer gegenüber der Mutante P2B08-H3 verbesserten Enantioselektivität identifiziert. Diese wurde durch GC-Analyse weiter untersucht.

Tabelle 5

Ausgewählte Lipase-Mutanten mit verbesserter Enantioselektivität
(3. Zyklus)

Mutante	V _{app} (S) [mOD/min]	V _{app} (R) [mOD/min]	E _{app} ¹⁾	% ee (nachGC) /% Umsatz	E-Wert ²⁾ (berechnet nach GC)
P3B13-D10	240,0	35,2	6,9	74,8 / 34,6	10,2

1) $E_{app} = V_{app}(S) / V_{app}(R)$

2) $E = \ln[1-c(1+ee_p)] / \ln[1-c(1-ee_p)]$ mit c = Umsatz, ee_p = ee-Wert des Produktes

Sequenzierung der positiven Mutanten

Durch Sequenzierung der positiven Mutanten konnten die Mutationen in den Lipase-Genen lokalisiert werden (siehe Anhang 2). Nach Zuordnung der Basen-triplets zu den entsprechenden Aminosäuren ergeben sich gegenüber der Wildtyp-Lipase aus *P. aeruginosa* folgende Aminosäure-Austausche :

P1B01-H1:	T103I (Thr ₁₀₃ --> Ile ₁₀₃), S149G (Ser ₁₄₉ --> Gly ₁₄₉)
P1B01-E4:	S149G (Ser ₁₄₉ --> Gly ₁₄₉)
P2B08-H3:	S149G (Ser ₁₄₉ --> Gly ₁₄₉), S155L (Ser ₁₅₅ --> Leu ₁₅₅)

Der Basenaustausch im Gen der Mutante P2B08-3H (C-->T) führt zu keinen Aminosäure-Austausch.

Die Mutanten P1B 01-E4, P2B 08-H3, P3B 13-D10 wurden unter den Bezeichnungen DSM 11 658, DSM 11 659 und DSM 11 659 am 16.07.1997 bei der DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, D-38124 Braunschweig, Mascheroder Weg 1b, hinterlegt.

Beispiel 2

Die Vorschriften zur Kultivierung der Bakterien, der *mutagenisierenden PCR* sowie des Testverfahrens auf Enantioselektivität sind analog zu Beispiel 1. Die Herstellung umfangreicher Mutantenbibliotheken erfolgt in diesem Beispiel jedoch durch *in vitro*-Rekombination.

Die für die *in vitro*-Rekombination verwendete DNA wird entweder durch *mutagenisierende PCR* generiert oder durch Vereinigung der DNA aus einer beliebigen Anzahl von Klonen aus einer oder mehreren, durch wiederholte *mutagenisierende PCR* entstandenen Generationen an Klonen gewonnen. Wenn die PCR-Produkte einer *mutagenisierenden PCR* Ausgangspunkt zur Gewinnung von DNA für die *in vitro*-Rekombination waren, wird wie folgt verfahren: Die PCR-Produkte der

mutagenisierenden PCR (siehe Beispiel 1) werden gereinigt, mit den Restriktionsendonucleasen *Apa* I und *BamH* I geschnitten, in den entsprechend geschnittenen Vektor pMUTS ligiert und anschließend nach *E. coli* JM 109 transformiert. Die Plasmid-DNA aus allen Transformationsklonen wird isoliert. War eine beliebige Anzahl ausgewählter Klone einer oder verschiedener Generationen an Mutantenklonen Ausgangspunkt für die Gewinnung von DNA für die *in vitro*-Rekombination, so wird die Plasmid-DNA des Vektors pMUT5 mit den jeweiligen Varianten des Lipasegens von *P. aeruginosa* isoliert und vereinigt. In beiden Fällen wird wie folgt weiter verfahren: Durch Restriktion mit der Endonuclease *Pvu* II wird ein 1430 Bp großes Fragment gewonnen, das neben dem Strukturgen für die Lipase von *P. aeruginosa* die Bindestellen der schon in der *mutagenisierenden PCR* verwendeten Primer A und B umfaßt. Dieses Fragment wird gereinigt und durch Inkubation mit Desoxyribonuclease I (DNase I aus *Rinder-Pankreas*) in zufällig generierte Fragmente geteilt. Dabei kann die Größe der Fragmente sowie die Fehlerrate der sich anschließenden Reassemblierung durch Wahl der Inkubationsbedingungen beeinflußt werden.

DNase I Behandlung:

In einem Gesamtvolumen von 100 µl werden 3 µg *Pvu* II-Fragmente in 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂ bzw. 10 mM MnCl₂ und 50 µg/ml BSA für 10-25 min bzw. 1-10 min bei 23 °C mit 0,075 U DNase I inkubiert. Die Reaktion wird durch 10 minütige Inkubation bei 93 °C terminiert. In Abhängigkeit von der Reaktionsdauer entstehen hierbei Fragmente von kleiner 500 Bp bis kleiner 10 Bp. Für den Fall, daß nur ein bestimmter Größenbereich verwendet wird, können diese Fragmente durch selektiven Elektrotransfer auf DEAE-Membran aus Agarosegelen gewonnen werden (nach F.M. Ausubel, et al., eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, 1989). Nach Reinigung der Fragmente durch das Qiagen Nucleotide Removal Kit® (Fa. Qiagen) wird die nachfolgende Reassemblierungsreaktion durchgeführt.

Reassemblierungsreaktion

10-30 ng der aus der DNase I-Restriktion stammenden Fragmente werden in 75 mM Tris/HCl pH 9,0, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% (w/v) Tween 20, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs mit 2U Goldstar Taq-Polymerase (Fa. Eurogentec) in einem Gesamtvolumen von 50 µl folgendem PCR-Programm unterzogen: 2 min 94 °C, 40 Zyklen mit 1 min 94 °C, 2 min 52 °C und 1 min 72 °C abschließend 7 min 72 °C. Die Taq-Polymerase wird nach dem 1 minütigen Denaturierungsschritt des 1. Zyklus zugegeben.

PCR

1 µl aus der Reassemblierungsreaktion wird in eine sich anschließende PCR-Reaktion eingesetzt, die sich mit folgenden Unterschieden, wie für die Reassemblierungsreaktion beschrieben, zusammensetzt: anstelle der DNase I-generierten Fragmente wird 1 µl der Reassemblierungsreaktion als Matrizen-DNA eingesetzt. Zusätzlich werden die Primer A und B in einer Konzentration von 0,2 mM sowie 10 % Dimethylsulfoxid zugesetzt. Das Zyklenschema lautet wie folgt:

2 min 98 °C, 30 Zyklen zu 1 min 94 °C, 2 min 64 °C, 1 min 72 °C und abschließend 7 min 72 °C; Es werden Parallelansätze durchgeführt. Die in diesen Reaktionen entstandenen PCR-Produkte werden gereinigt, mit den Restriktionendonukleasen Apa I und Bam HI restriktiert und wie im Abschnitt "mutagenisierende PCR" von Beispiel 1 beschrieben kloniert.

Ergebnisse (*in vitro*-Rekombination):

Es wurden 12 Klone aus der 1. Generation der durch *mutagenisierende PCR* erhaltenen Mutantenbibliothek (siehe Beispiel 1) für die *in vitro*-Rekombination eingesetzt. Folgende Klone, die im Screening-Test verbesserte Enantioselektivität gezeigt hatten, wurden benutzt:

P1B01-A2, P1B01-A6, P1B01-D2, P1B01-D5, P1B01-E1, P1B01-E4, P1B01-F3, P1B01-F11, P1B01-H1, P1B01-H3, P1B01-F12.

Die nach der oben beschriebenen Vorgehensweise rekombinierte DNA dieser Klone wird wie im Abschnitt "mutagenisierende PCR" angegeben kloniert und die Kulturüberstände zum Test auf Enantioselektivität eingesetzt. Es wurden ca. 1000 rekombinante Klone getestet. Die beiden identifizierten Rekombinanten S2A01-E11 und S2A02-G3 zeigen gegenüber der besten Mutante der 1. Generation (P1B01-E4) aus Beispiel 1 eine signifikante Verbesserung der Enantioselektivität.

Tabelle 6

Ausgewählte Lipase-Mutanten mit verbesserter Enantioselektivität (*in vitro*-Rekombination)

Mutante	V _{app} (S) [mOD/min]	V _{app} (R) [mOD/min]	E _{app} ¹⁾	% ee (nachGC) /% Umsatz	E-Wert ²⁾ (ber. nach GC)
S2A01-E11	145,6	41,6	3,5	41,0 / 27,0	2,8
S2A02-G3	210,8	62,0	3,4	38,0 / 23,0	2,5

1) $E_{app} = V_{app}(S) / V_{app}(R)$

2) $E = \ln[1-c(1+ee_p)] / \ln[1-c(1-ee_p)]$ mit c = Umsatz, ee_p = ee-Wert des Produktes

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Studiengesellschaft Kohle mbH
- (B) STRASSE: Kaiser-Wilhelm-Platz 1
- (C) ORT: Muelheim an der Ruhr
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 45470

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Verfahren zur Herstellung und Identifizierung neuer Hydrolasen mit verbesserten Eigenschaften

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 12

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30
(EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ. ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "synthetische DNA"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GCGCAATTAA CCCTCACTAA AGGGAACAAA

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 27 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "synthetische DNA"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

GCGTAATACG ACTCACTATA GGGCGAA

27

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1049 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 85..1017

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide
 (B) LAGE:163..1017

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GGATCCCCCG GTTCTCCCGG AAGGATTCTGG GCGATGGCTG GCAGGACGCG CCCCTCGGCC	60	
CCATCAACCT GAGATGAGAA CAAC ATG AAG AAG AAG TAT CTG CTC CCC CTC	111	
Met Lys Lys Lys Tyr Leu Leu Pro Leu		
-26 -25	-20	
GGC CTG GCC ATC GGT CTC GCC TCT CTC GCT GCC AGC CCT CTG ATC CAG	159	
Gly Leu Ala Ile Gly Leu Ala Ser Leu Ala Ala Ser Pro Leu Ile Gln		
-15	-10	-5
GCC AGC ACC TAC ACC CAG ACC AAA TAC CCC ATC GTG CTG GCC CAC GGC	207	
Ala Ser Thr Tyr Thr Gln Thr Lys Tyr Pro Ile Val Leu Ala His Gly		
1	5	10
15		
ATG CTC GGC TTC GAC AAC ATC CTC GGG GTC GAC TAC TGG TTC GGC ATT	255	
Met Leu Gly Phe Asp Asn Ile Leu Gly Val Asp Tyr Trp Phe Gly Ile		
20	25	30
CCC AGC GCC TTG CGC CGT GAC GGT GCC CAG GTC TAC GTC ACC GAA GTC	303	
Pro Ser Ala Leu Arg Arg Asp Gly Ala Gln Val Tyr Val Thr Glu Val		
35	40	45
AGC CAG TTG GAC ACC TCG GAA GTC CGC GGC GAG CAG TTG CTG CAA CAG	351	
Ser Gln Leu Asp Thr Ser Glu Val Arg Gly Glu Gln Leu Leu Gln Gln		
50	55	60
GTG GAG GAA ATC GTC GCC CTC AGC GGC CAG CCC AAG GTC AAC CTG ATC	399	
Val Glu Glu Ile Val Ala Leu Ser Gly Gln Pro Lys Val Asn Leu Ile		
65	70	75

GGC CAC AGC CAC GGC GGG CCG ACC ATC CGC TAC GTC GCC GCC GTA CGT			447
Gly His Ser His Gly Gly Pro Thr Ile Arg Tyr Val Ala Ala Val Arg			
80	85	90	95
CCC GAC CTG ATC GCT TCC GCC ATC AGC GTC GGC GCC CCG CAC AAG GGT			495
Pro Asp Leu Ile Ala Ser Ala Ile Ser Val Gly Ala Pro His Lys Gly			
100	105	110	
TCG GAC ACC GCC GAC TTC CTG CGC CAG ATC CCA CCG GGT TCG GCC GGC			543
Ser Asp Thr Ala Asp Phe Leu Arg Gln Ile Pro Pro Gly Ser Ala Gly			
115	120	125	
GAG GCA GTC CTC TCC GGG CTG GTC AAC AGC CTC GGC GCG CTG ATC AGC			591
Glu Ala Val Leu Ser Gly Leu Val Asn Ser Leu Gly Ala Leu Ile Ser			
130	135	140	
TTC CTT TCC AGC GGC GGC ACC GGT ACG CAG AAT TCA CTG GGC TCG CTG			639
Phe Leu Ser Ser Gly Gly Thr Gly Thr Gln Asn Ser Leu Gly Ser Leu			
145	150	155	
GAG TCG CTG AAC AGC GAG GGT GCC GCG CGC TTC AAC GCC AAG TAC CCG			687
Glu Ser Leu Asn Ser Glu Gly Ala Ala Arg Phe Asn Ala Lys Tyr Pro			
160	165	170	175
CAG GGC ATC CCC ACC TCG GCC TGC GGC GAA GGC GCC TAC AAG GTC AAC			735
Gln Gly Ile Pro Thr Ser Ala Cys Gly Glu Gly Ala Tyr Lys Val Asn			
180	185	190	
GGC GTG AGC TAT TAC TCC TGG AGC GGT TCC TCG CCG CTG ACC AAC TTC			783
Gly Val Ser Tyr Tyr Ser Trp Ser Gly Ser Ser Pro Leu Thr Asn Phe			
195	200	205	
CTC GAT CCG AGC GAC GCC TTC CTC GGC GCC TCG TCG CTG ACC TTC AAG			831

Leu Asp Pro Ser Asp Ala Phe Leu Gly Ala Ser Ser Leu Thr Phe Lys			
210	215	220	
AAC GGC ACC GCC AAC GAC GGC CTG GTC GGC ACC TGC AGT TCG CAC CTG			879
Asn Gly Thr Ala Asn Asp Gly Leu Val Gly Thr Cys Ser Ser His Leu			
225	230	235	
GGC ATG GTG ATC CGC GAC AAC TAC CGG ATG AAC CAC CTG GAC GAG GTG			927
Gly Met Val Ile Arg Asp Asn Tyr Arg Met Asn His Leu Asp Glu Val			
240	245	250	255
AAC CAG GTC TTC GGC CTC ACC AGC CTG TTC GAG ACC AGC CCG GTC AGC			975
Asn Gln Val Phe Gly Leu Thr Ser Leu Phe Glu Thr Ser Pro Val Ser			
260	265	270	
GTC TAC CGC CAG CAC GCC AAC CGC CTG AAG AAC GCC AGC CTG			1017
Val Tyr Arg Gln His Ala Asn Arg Leu Lys Asn Ala Ser Leu			
275	280	285	
TAGGACCCCG GCCGGGGCCT CGGCCCGGGC CC			1049

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 311 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Met Lys Lys Lys Tyr Leu Leu Pro Leu Gly Leu Ala Ile Gly Leu Ala
 -26 -25 -20 -15

Ser Leu Ala Ala Ser Pro Leu Ile Gln Ala Ser Thr Tyr Thr Gln Thr
 -10 -5 1 5

Lys Tyr Pro Ile Val Leu Ala His Gly Met Leu Gly Phe Asp Asn Ile
 10 15 20

Leu Gly Val Asp Tyr Trp Phe Gly Ile Pro Ser Ala Leu Arg Arg Asp
 25 30 35

Gly Ala Gln Val Tyr Val Thr Glu Val Ser Gln Leu Asp Thr Ser Glu
 40 45 50

Val Arg Gly Glu Gln Leu Leu Gln Gln Val Glu Glu Ile Val Ala Leu
 55 60 65 70

Ser Gly Gln Pro Lys Val Asn Leu Ile Gly His Ser His Gly Gly Pro
 75 80 85

Thr Ile Arg Tyr Val Ala Ala Val Arg Pro Asp Leu Ile Ala Ser Al
 90 95 100

Ile Ser Val Gly Ala Pro His Lys Gly Ser Asp Thr Ala Asp Phe Le
 105 110 115

Arg Gln Ile Pro Pro Gly Ser Ala Gly Glu Ala Val Leu Ser Gly Le
 120 125 130

Val Asn Ser Leu Gly Ala Leu Ile Ser Phe Leu Ser Ser Gly Gly Th
 135 140 145 150

Gly Thr Gln Asn Ser Leu Gly Ser Leu Glu Ser Leu Asn Ser Glu Gi
 155 160 165

Ala Ala Arg Phe Asn Ala Lys Tyr Pro Gln Gly Ile Pro Thr Ser A
 170 175 180

Cys Gly Glu Gly Ala Tyr Lys Val Asn Gly Val Ser Tyr Tyr Ser Trp
 185 190 195
 Ser Gly Ser Ser Pro Leu Thr Asn Phe Leu Asp Pro Ser Asp Ala Phe
 200 205 210
 Leu Gly Ala Ser Ser Leu Thr Phe Lys Asn Gly Thr Ala Asn Asp Gly
 215 220 225 230
 Leu Val Gly Thr Cys Ser Ser His Leu Gly Met Val Ile Arg Asp Asn
 235 240 245
 Tyr Arg Met Asn His Leu Asp Glu Val Asn Gln Val Phe Gly Leu Th
 250 255 260
 Ser Leu Phe Glu Thr Ser Pro Val Ser Val Tyr Arg Gln His Ala As
 265 270 275
 Arg Leu Lys Asn Ala Ser Leu
 285

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1049 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
(B) LAGE: 85..1017

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide
 (B) LAGE: 163..1017

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

GGATCCCCCG GTTCTCCCGG AAGGATTCTGG GCGATGGCTG GCAGGACGCG CCCCTCGGCC	60		
CCATCAACCT GAGATGAGAA CAAC ATG AAG AAG AAG TCT CTG CTC CCC CTC	111		
Met Lys Lys Lys Ser Leu Leu Pro Leu			
-26 -25	-20		
GGC CTG GCC ATC GGT CTC GCC TCT CTC GCT GCC AGC CCT CTG ATC CAG	159		
Gly Leu Ala Ile Gly Leu Ala Ser Leu Ala Ala Ser Pro Leu Ile Gln			
-15	-10	-5	
GCC AGC ACC TAC ACC CAG ACC AAA TAC CCC ATC GTG CTG GCC CAC GGC	207		
Ala Ser Thr Tyr Thr Gln Thr Lys Tyr Pro Ile Val Leu Ala His Gly			
1	5	10	15
ATG CTC GGC TTC GAC AAC ATC CTC GGG GTC GAC TAC TGG TTC GGC ATT	255		
Met Leu Gly Phe Asp Asn Ile Leu Gly Val Asp Tyr Trp Phe Gly Ile			
20	25	30	
CCC AGC GCC TTG CGC CGT GAC GGT GCC CAG GTC TAC GTC ACC GAA GTC	303		
Pro Ser Ala Leu Arg Arg Asp Gly Ala Gln Val Tyr Val Thr Glu Val			
35	40	45	
AGC CAG TTG GAC ACC TCG GAA GTC CGC GGC GAG CAG TTG CTG CAA CAG	351		
Ser Gln Leu Asp Thr Ser Glu Val Arg Gly Glu Gln Leu Leu Gln Gln			
50	55	60	
GTG GAG GAA ATC GTC GCC CTC AGC GGC CAG CCC AAG GTC AAC CTG ATC	399		

Val Glu Glu Ile Val Ala Leu Ser Gly Gln Pro Lys Val Asn Leu Ile				
65	70	75		
GGC CAC AGC CAC GGC GGG CCG ACC ATC CGC TAC GTC GCC GCC GTA CGT				447
Gly His Ser His Gly Gly Pro Thr Ile Arg Tyr Val Ala Ala Val Arg				
80	85	90	95	
CCC GAC CTG ATC GCT TCC GCC ACC AGC GTC GGC GCC CCG CAC AAG GGT				495
Pro Asp Leu Ile Ala Ser Ala Thr Ser Val Gly Ala Pro His Lys Gly				
100	105	110		
TCT GAC ACC GCC GAC TTC CTG CGC CAG ATC CCA CCG GGT TCG GCC GGC				543
Ser Asp Thr Ala Asp Phe Leu Arg Gln Ile Pro Pro Gly Ser Ala Gly				
115	120	125		
GAG GCA GTC CTC TCC GGG CTG GTC AAC AGC CTC GGC GCG CTG ATC AGC				591
Glu Ala Val Leu Ser Gly Leu Val Asn Ser Leu Gly Ala Leu Ile Ser				
130	135	140		
TTC CTT TCC AGC GGC GGC ACC GGT ACG CAG AAT TCA CTG GGC TCG CTG				639
Phe Leu Ser Ser Gly Gly Thr Gly Thr Gln Asn Ser Leu Gly Ser Leu				
145	150	155		
GAG TCG CTG AAC AGC GAG GGT GCC GCG CGC TTC AAC GCC AAG TAC CCG				687
Glu Ser Leu Asn Ser Glu Gly Ala Ala Arg Phe Asn Ala Lys Tyr Pro				
160	165	170	175	
CAG GGC ATC CCC ACC TCG GCC TGC GGC GAA GGC GCC TAC AAG GTC AAC				735
Gln Gly Ile Pro Thr Ser Ala Cys Gly Glu Gly Ala Tyr Lys Val Asn				
180	185	190		
GGC GTG AGC TAT TAC TCC TGG AGC GGT TCC TCG CCG CTG ACC AAC TTC				783
Gly Val Ser Tyr Tyr Ser Trp Ser Gly Ser Ser Pro Leu Thr Asn Phe				
195	200	205		

CTC GAT CCG AGC GAC GCC TTC CTC GGC GCC TCG TCG CTG ACC TTC AAG		831
Leu Asp Pro Ser Asp Ala Phe Leu Gly Ala Ser Ser Leu Thr Phe Lys		
210	215	220
AAC GGC ACC GCC AAC GAC GGC CTG GTC GGC ACC TGC AGT TCG CAC CTG		879
Asn Gly Thr Ala Asn Asp Gly Leu Val Gly Thr Cys Ser Ser His Leu		
225	230	235
GGC ATG GTG ATC CGC GAC AAC TAC CGG ATG AAC CAC CTG GAC GAG GTG		927
Gly Met Val Ile Arg Asp Asn Tyr Arg Met Asn His Leu Asp Glu Val		
240	245	250
255		
AAC CAG GTC TTC GGC CTC ACC AGC CTG TTC GAG ACC AGC CCG GTC AGC		975
Asn Gln Val Phe Gly Leu Thr Ser Leu Phe Glu Thr Ser Pro Val Ser		
260	265	270
GTC TAC CGC CAG CAC GCC AAC CGC CTG AAG AAC GCC AGC CTG		1017
Val Tyr Arg Gln His Ala Asn Arg Leu Lys Asn Ala Ser Leu		
275	280	285
TAGGACCCCG GCCGGGGCCT CGGCCCGGGC CC		1049

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 311 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

Met Lys Lys Lys Ser Leu Leu Pro Leu Gly Leu Ala Ile Gly Leu Ala
 -26 -25 -20 -15

Ser Leu Ala Ala Ser Pro Leu Ile Gln Ala Ser Thr Tyr Thr Gln Thr
 -10 -5 1 5

Lys Tyr Pro Ile Val Leu Ala His Gly Met Leu Gly Phe Asp Asn Ile
 10 15 20

Leu Gly Val Asp Tyr Trp Phe Gly Ile Pro Ser Ala Leu Arg Arg Asp
 25 30 35

Gly Ala Gln Val Tyr Val Thr Glu Val Ser Gln Leu Asp Thr Ser Glu
 40 45 50

Val Arg Gly Glu Gln Leu Leu Gln Gln Val Glu Glu Ile Val Ala Leu
 55 60 65 70

Ser Gly Gln Pro Lys Val Asn Leu Ile Gly His Ser His Gly Pro
 75 80 85

Thr Ile Arg Tyr Val Ala Ala Val Arg Pro Asp Leu Ile Ala Ser Ala
 90 95 100

Thr Ser Val Gly Ala Pro His Lys Gly Ser Asp Thr Ala Asp Phe Leu
 105 110 115

Arg Gln Ile Pro Pro Gly Ser Ala Gly Glu Ala Val Leu Ser Gly Leu
 120 125 130

Val Asn Ser Leu Gly Ala Leu Ile Ser Phe Leu Ser Ser Gly Gly Thr
 135 140 145 150

Gly Thr Gln Asn Ser Leu Gly Ser Leu Glu Ser Leu Asn Ser Glu Gly
 155 160 165

Ala Ala Arg Phe Asn Ala Lys Tyr Pro Gln Gly Ile Pro Thr Ser Ala
 170 175 180

Cys Gly Glu Gly Ala Tyr Lys Val Asn Gly Val Ser Tyr Tyr Ser Trp
 185 190 195
 Ser Gly Ser Ser Pro Leu Thr Asn Phe Leu Asp Pro Ser Asp Ala Phe
 200 205 210
 Leu Gly Ala Ser Ser Leu Thr Phe Lys Asn Gly Thr Ala Asn Asp Gly
 215 220 225 230
 Leu Val Gly Thr Cys Ser Ser His Leu Gly Met Val Ile Arg Asp Asn
 235 240 245
 Tyr Arg Met Asn His Leu Asp Glu Val Asn Gln Val Phe Gly Leu Thr
 250 255 260
 Ser Leu Phe Glu Thr Ser Pro Val Ser Val Tyr Arg Gln His Ala Asn
 265 270 275
 Arg Leu Lys Asn Ala Ser Leu
 280 285

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1049 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 85..1017

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide
 (B) LAGE: 163..1017

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

GGATCCCCCG	GTTCTCCCGG	AAGGATTCTGG	GCGATGGCTG	GCAGGACGCG	CCCCTCGGCC	60
CCATCAACCT	GAGATGAGAA	CAAC ATG AAG AAG	TCT CTG CTC CCC CTC			111
		Met Lys Lys Lys	Ser Leu Leu Pro Leu			
		-26 -25		-20		
GGC CTG GCC ATC GGT	CTC GCC TCT CTC GCT	GCC AGC CCT CTG ATC CAG				159
Gly Leu Ala Ile	Gly Leu Ala Ser Leu Ala Ala Ser Pro Leu Ile Gln					
-15	-10	-5				
GCC AGC ACC TAC ACC CAG ACC AAA TAC CCC ATC GTG CTG GCC CAC GGC						207
Ala Ser Thr Tyr Thr Gln Thr Lys Tyr Pro Ile Val Leu Ala His Gly						
1	5	10	15			
ATG CTC GGC TTC GAC AAC ATC CTT GGG GTC GAC TAC TGG TTC GGC ATT						255
Met Leu Gly Phe Asp Asn Ile Leu Gly Val Asp Tyr Trp Phe Gly Ile						
20	25	30				
CCC AGC GCC TTG CGC CGT GAC GGT GCC CAG GTC TAC GTC ACC GAA GTC						303
Pro Ser Ala Leu Arg Arg Asp Gly Ala Gln Val Tyr Val Thr Glu Val						
35	40	45				
AGC CAG TTG GAC ACC TCG GAA GTC CGC GGC GAG CAG TTG CTG CAA CAG						351
Ser Gln Leu Asp Thr Ser Glu Val Arg Gly Glu Gln Leu Leu Gln Gln						
50	55	60				
GTG GAG GAA ATC GTC GCC CTG AGC GGC CAG CCC AAG GTC AAC CTG ATC						399

Val	Glu	Glu	Ile	Val	Ala	Leu	Ser	Gly	Gln	Pro	Lys	Val	Asn	Leu	Ile	
65				70						75						
GGC CAC AGC CAC GGC GGG CCG ACC ATC CGC TAC GTC GCC GCC GTA CGT															447	
Gly	His	Ser	His	Gly	Gly	Pro	Thr	Ile	Arg	Tyr	Val	Ala	Ala	Val	Arg	
80				85					90					95		
CCC GAC CTG ATC GCT TCC GCC ACC AGC GTC GGC GCC CCG CAC AAG GGT															495	
Pro	Asp	Leu	Ile	Ala	Ser	Ala	Thr	Ser	Val	Gly	Ala	Pro	His	Lys	Gly	
				100				105				110				
TGC GAC ACC GCC GAC TTC CTG CGC CAG ATC CCA CCG GGT TCG GCC GGC															543	
Ser	Asp	Thr	Ala	Asp	Phe	Leu	Arg	Gln	Ile	Pro	Pro	Gly	Ser	Ala	Gly	
				115				120				125				
GAG GCA GTC CTC TCC GGG CTG GTC AAC AGC CTC GGC GCG CTG ATC AGC															591	
Glu	Ala	Val	Leu	Ser	Gly	Leu	Val	Asn	Ser	Leu	Gly	Ala	Leu	Ile	Ser	
				130			135				140					
TTC CTT TCC AGC GGC GGC ACC GGT ACG CAG AAT TTA CTG GGC TCG CTG															639	
Phe	Leu	Ser	Ser	Gly	Gly	Thr	Gly	Thr	Gln	Asn	Leu	Leu	Gly	Ser	Leu	
				145			150				155					
TAG TCG CTG AAC AGC GAG GGT GCC GCG CGC TTC AAC GCC AAG TAC CCG															687	
Glu	Ser	Leu	Asn	Ser	Glu	Gly	Ala	Ala	Arg	Phe	Asn	Ala	Lys	Tyr	Pro	
				160			165			170			175			
CAG GGC ATC CCC ACC TCG GCC TGC GGC GAA GGC GCC TAC AAG GTC AAC															735	
Gln	Gly	Ile	Pro	Thr	Ser	Ala	Cys	Gly	Glu	Gly	Ala	Tyr	Lys	Val	Asn	
				180			185			190						
GGC GTG AGC TAT TAC TCC TGG AGC GGT TCC TCG CCG CTG ACC AAC TTC															783	
Gly	Val	Ser	Tyr	Tyr	Ser	Trp	Ser	Gly	Ser	Ser	Pro	Leu	Thr	Asn	Phe	
				195			200			205						

CTC GAT CCG AGC GAC GCC TTC CTC GGC GCC TCG TCG CTG ACC TTC AAG		831
Leu Asp Pro Ser Asp Ala Phe Leu Gly Ala Ser Ser Leu Thr Phe Lys		
210	215	220
AAC GGC ACC GCC AAC GAC GGC CTG GTC GGC ACC TGC AGT TCG CAC CTG		879
Asn Gly Thr Ala Asn Asp Gly Leu Val Gly Thr Cys Ser Ser His Leu		
225	230	235
GGC ATG GTG ATC CGC GAC AAC TAC CGG ATG AAC CAC CTG GAC GAG GTG		927
Gly Met Val Ile Arg Asp Asn Tyr Arg Met Asn His Leu Asp Glu Val		
240	245	250
255		
AAC CAG GTC TTC GGC CTC ACC AGC CTG TTC GAG ACC AGC CCG GTC AGC		975
Asn Gln Val Phe Gly Leu Thr Ser Leu Phe Glu Thr Ser Pro Val Ser		
260	265	270
GTC TAC CGC CAG CAC GCC AAC CGC CTG AAG AAC GCC AGC CTG		1017
Val Tyr Arg Gln His Ala Asn Arg Leu Lys Asn Ala Ser Leu		
275	280	285
TAGGACCCCG GCCGGGGCCT CGGCCCGGGC CC		1049

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 311 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

Met Lys Lys Lys Ser Leu Leu Pro Leu Gly Leu Ala Ile Gly Leu Ala
 -26 -25 -20 -15

Ser Leu Ala Ala Ser Pro Leu Ile Gln Ala Ser Thr Tyr Thr Gln Thr
-10 -5 1 5

Lys Tyr Pro Ile Val Leu Ala His Gly Met Leu Gly Phe Asp Asn Ile
10 15 20

Leu Gly Val Asp Tyr Trp Phe Gly Ile Pro Ser Ala Leu Arg Arg Asp
25 30 35

Gly Ala Gln Val Tyr Val Thr Glu Val Ser Gln Leu Asp Thr Ser Glu
40 45 50

Val Arg Gly Glu Gln Leu Leu Gln Gln Val Glu Glu Ile Val Ala Leu
55 60 65 70

Ser Gly Gln Pro Lys Val Asn Leu Ile Gly His Ser His Gly Pro
75 80 85

Thr Ile Arg Tyr Val Ala Ala Val Arg Pro Asp Leu Ile Ala Ser Ala
90 95 100

Thr Ser Val Gly Ala Pro His Lys Gly Ser Asp Thr Ala Asp Phe Leu
105 110 115

Arg Gln Ile Pro Pro Gly Ser Ala Gly Glu Ala Val Leu Ser Gly Leu
120 125 130

Val Asn Ser Leu Gly Ala Leu Ile Ser Phe Leu Ser Ser Gly Thr
135 140 145 150

Gly Thr Gln Asn Leu Leu Gly Ser Leu Glu Ser Leu Asn Ser Glu Gly
155 160 165

Ala Ala Arg Phe Asn Ala Lys Tyr Pro Gln Gly Ile Pro Thr Ser Ala
170 175 180

Cys Gly Glu Gly Ala Tyr Lys Val Asn Gly Val Ser Tyr Tyr Ser Trp
185 190 195

Ser Gly Ser Ser Pro Leu Thr Asn Phe Leu Asp Pro Ser Asp Ala Phe
200 205 210

Leu Gly Ala Ser Ser Leu Thr Phe Lys Asn Gly Thr Ala Asn Asp Gly
215 220 225 230

Leu Val Gly Thr Cys Ser Ser His Leu Gly Met Val Ile Arg Asp Asn
235 240 245

Tyr Arg Met Asn His Leu Asp Glu Val Asn Gln Val Phe Gly Leu Thr
250 255 260

Ser Leu Phe Glu Thr Ser Pro Val Ser Val Tyr Arg Gln His Ala Asn
265 270 275

Arg Leu Lys Asn Ala Ser Leu
280 285

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1049 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE:85..1017

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide
- (B) LAGE:163..1017

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

GGATCCCCG	GTTCTCCGG	AAGGATTCTGG	GCGATGGCTG	GCAGGGACGCG	CCCCTCGGCC	60
CCATCAACCT	GAGATGAGAA	CAAC ATG AAG AAG	AAG TCT CTG CTC CCC CTC			111
		Met Lys Lys Ser Leu Leu Pro Leu				
-26	-25		-20			
GGC CTG GCC ATC GGT CTC GCC TCT CTC GCT GCC AGC CCT CTG ATC CAG						159
Gly Leu Ala Ile Gly Leu Ala Ser Leu Ala Ala Ser Pro Leu Ile Gln						
-15	-10		-5			
GCC AGC ACC TAC ACC CAG ACC AAA TAC CCC ATC GTG CTG GCC CAC GGC						207
Ala Ser Thr Tyr Thr Gln Thr Lys Tyr Pro Ile Val Leu Ala His Gly						
1	5	10	15			
ATG CTC GGC TTC GAC AAC ATC CTT GGG GTC GAC TAC TGG TTC GGC ATT						255
Met Leu Gly Phe Asp Asn Ile Leu Gly Val Asp Tyr Trp Phe Gly Ile						
20	25	30				
CCC AGC GCC TTG CGC CGT GAC GGT GCC CAG GTC TAC GTC ACC GAA GGC						303
Pro Ser Ala Leu Arg Arg Asp Gly Ala Gln Val Tyr Val Thr Glu Gly						
35	40	45				
AGC CAG TTG GAC ACC TCG GAA GTC CGC GGC GAG CAG TTG CTG CAA CAG						351
Ser Gln Leu Asp Thr Ser Glu Val Arg Gly Glu Gln Leu Leu Gln Gln						
50	55	60				

GTG GAG GAA ATC GTC GCC CTC AGC GGC CAG CCC AAG GTC AAC CTG ATC			399
Val Glu Glu Ile Val Ala Leu Ser Gly Gln Pro Lys Val Asn Leu Ile			
65	70	75	
GGC CAC AGC CAC GGC GGG CCG ACC ATC CGC TAC GTC GCC GCC GTA CGT			447
Gly His Ser His Gly Gly Pro Thr Ile Arg Tyr Val Ala Ala Val Arg			
80	85	90	95
CCC GAC CTG ATC GCT TCC GCC ACC AGC GTC GGC GCC CCG CAC AAG GGT			495
Pro Asp Leu Ile Ala Ser Ala Thr Ser Val Gly Ala Pro His Lys Gly			
100	105	110	
TCG GAC ACC GCC GAC TTC CTG CGC CAG ATC CCA CCG GGT TCG GCC GGC			543
Ser Asp Thr Ala Asp Phe Leu Arg Gln Ile Pro Pro Gly Ser Ala Gly			
115	120	125	
GAG GCA GTC CTC TCC GGG CTG GTC AAC AGC CTC GGC GCG CTG ATC AGC			591
Glu Ala Val Leu Ser Gly Leu Val Asn Ser Leu Gly Ala Leu Ile Ser			
130	135	140	
TTC CTT TCC AGC GGC GGC ACC GGT ACG CAG AAT TTA CTG GGC TCG CTG			639
Phe Leu Ser Ser Gly Gly Thr Gly Thr Gln Asn Leu Leu Gly Ser Leu			
145	150	155	
GAG TCG CTG AAC AGC GAG GGT GCC GCG CGC TTC AAC GCC AAG TAC CCG			687
Glu Ser Leu Asn Ser Glu Gly Ala Ala Arg Phe Asn Ala Lys Tyr Pro			
160	165	170	175
CAG GGC ATC CCC ACC TCG GCC TGC GGC GAA GGC GCC TAC AAG GTC AAC			735
Gln Gly Ile Pro Thr Ser Ala Cys Gly Glu Gly Ala Tyr Lys Val Asn			
180	185	190	
GGC GTG AGC TAT TAC TCC TGG AGC GGT TCC TCG CCG CTG ACC AAC TTC			783

Gly Val Ser Tyr Tyr Ser Trp Ser Gly Ser Ser Pro Leu Thr Asn Phe			
195	200	205	
CTC GAT CCG AGC GAC GCC TTC CTC GGC GCC TCG TCG CTG ACC TTC AAG			831
Leu Asp Pro Ser Asp Ala Phe Leu Gly Ala Ser Ser Leu Thr Phe Lys			
210	215	220	
AAC GGC ACC GCC AAC GAC GGC CTG GTC GGC ACC TGC AGT TCG CAC CTG			879
Asn Gly Thr Ala Asn Asp Gly Leu Val Gly Thr Cys Ser Ser His Leu			
225	230	235	
GGC ATG GTG ATC CGC GAC AAC TAC CGG ATG AAC CAC CTG GAC GAG GTG			927
Gly Met Val Ile Arg Asp Asn Tyr Arg Met Asn His Leu Asp Glu Val			
240	245	250	255
AAC CAG GTC TTC GGC CTC ACC AGC CTG TTC GAG ACC AGC CCG GTC AGC			975
Asn Gln Val Phe Gly Leu Thr Ser Leu Phe Glu Thr Ser Pro Val Ser			
260	265	270	
GTC TAC CGC CAG CAC GCC AAC CGC CTG AAG AAC GCC AGC CTG			1017
Val Tyr Arg Gln His Ala Asn Arg Leu Lys Asn Ala Ser Leu			
275	280	285	
'AGGACCCCG GCCGGGGCCT CGGCCCGGGC CC			1049

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 311 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

Met Lys Lys Lys Ser Leu Leu Pro Leu Gly Leu Ala Ile Gly Leu Ala
 -26 -25 -20 -15

Ser Leu Ala Ala Ser Pro Leu Ile Gln Ala Ser Thr Tyr Thr Gln Thr
 -10 -5 1 5

Lys Tyr Pro Ile Val Leu Ala His Gly Met Leu Gly Phe Asp Asn Ile
 10 15 20

Leu Gly Val Asp Tyr Trp Phe Gly Ile Pro Ser Ala Leu Arg Arg Asp
 25 30 35

Gly Ala Gln Val Tyr Val Thr Glu Gly Ser Gln Leu Asp Thr Ser Glu
 40 45 50

Val Arg Gly Glu Gln Leu Leu Gln Val Glu Glu Ile Val Ala Leu
 55 60 65 70

Ser Gly Gln Pro Lys Val Asn Leu Ile Gly His Ser His Gly Gly Pro
 75 80 85

Thr Ile Arg Tyr Val Ala Ala Val Arg Pro Asp Leu Ile Ala Ser Ala
 90 95 100

Thr Ser Val Gly Ala Pro His Lys Gly Ser Asp Thr Ala Asp Phe Leu
 105 110 115

Arg Gln Ile Pro Pro Gly Ser Ala Gly Glu Ala Val Leu Ser Gly Leu
 120 125 130

Val Asn Ser Leu Gly Ala Leu Ile Ser Phe Leu Ser Ser Gly Gly Thr
 135 140 145 150

Gly Thr Gln Asn Leu Leu Gly Ser Leu Glu Ser Leu Asn Ser Glu Gly
 155 160 165

Ser Gly Ser Ser Pro Leu Thr Asn Phe Leu Asp Pro Ser Asp Ala Phe
 200 205 210

Leu Gly Ala Ser Ser Leu Thr Phe Lys Asn Gly Thr Ala Asn Asp Gly
 .15 220 225 230

Tyr Arg Met Asn His Leu Asp Glu Val Asn Gln Val Phe Gly Leu Thr
 250 255 260

Arg Leu Lys Asn Ala Ser Leu
280 285

(2) ANGABEN ZU SEQ. ID NO: 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1047 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÄSSEL: CDS
- (B) LAGE:84..1016

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÄSSEL: mat_peptide
- (B) LAGE:162..1016

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

GGATCCCCGG	TTCTCCCGGA	AGGATTGGGG	CGATGGCTGG	CAGGACGCC	CCCTCGGCC	60
CATCAACCTG AGATGAGAAC AAC ATG AAG AAG TCT CTG CTC CCC CTC						110
			Met Lys Lys Lys Ser Leu Leu Pro Leu			
			-26 -25		-20	
GGC CTG GCC ATC GGT CTC GCC TCT CTC GCT GCC AGC CCT CTG ATC CAG						158
Gly Leu Ala Ile Gly Leu Ala Ser Leu Ala Ala Ser Pro Leu Ile Gln						
-15		-10		-5		
GCC AGC ACC TAC ACC CAG ACC AAA TAC CCC ATC GTG CTG GCC CAC GGC						206
Ala Ser Thr Tyr Thr Gln Thr Lys Tyr Pro Ile Val Leu Ala His Gly						
1	5	10	15			
ATG CTC GGC TTC GAC AAC ATC CTC GGG GTC GAC TAC TGG TTC GGC ATT						254
Met Leu Gly Phe Asp Asn Ile Leu Gly Val Asp Tyr Trp Phe Gly Ile						
20	25	30				
CCC AGC GCC TTG CGC CGT GAC GGT GCC CAG GTC TAC GTC ACC GAA GTC						302
Pro Ser Ala Leu Arg Arg Asp Gly Ala Gln Val Tyr Val Thr Glu Val						
35	40	45				
AGC CAG TTG GAC ACC TCG GAA GTC CGC GGC GAG CAG TTG CTG CAA CAG						350
Ser Gln Leu Asp Thr Ser Gln Val Arg Gly Glu Gln Leu Leu Gln Gln						
50	55	60				

GTG GAG GAA ATC GTC GCC CTC AGC GGC CAG CCC AAG GTC AAC CTG ATC		398
Val Glu Glu Ile Val Ala Leu Ser Gly Gln Pro Lys Val Asn Leu Ile		
65	70	75
GGC CAC AGC CAC GGC GGG CCG ACC ATC CGC TAC GTC GCC GCC GTA CGT		446
Gly His Ser His Gly Gly Pro Thr Ile Arg Tyr Val Ala Ala Val Arg		
80	85	90
CCC GAC CTG ATC GCT TCC GCC ACC AGC GTC GGC GCC CCG CAC AAG GGT		494
Pro Asp Leu Ile Ala Ser Ala Thr Ser Val Gly Ala Pro His Lys Gly		
100	105	110
TCG GAC ACC GCC GAC TTC CTG CGC CAG ATC CCA CCG GGT TCG GCC GGC		542
Ser Asp Thr Ala Asp Phe Leu Arg Gln Ile Pro Pro Gly Ser Ala Gly		
115	120	125
GAG GCA GTC CTC TCC GGG CTG GTC AAC AGC CTC GGC GCG CTG ATC AGC		590
Glu Ala Val Leu Ser Gly Leu Val Asn Ser Leu Gly Ala Leu Ile Ser		
130	135	140
TTC CTT TCC AGC GGC AGC ACC GGT ACG CAG AAT TCA CTG GGC TCG CTG		638
Phe Leu Ser Ser Gly Ser Thr Gly Thr Gln Asn Ser Leu Gly Ser Leu		
145	150	155
GAG TCG CTG AAC AGC GAG GGT GCC GCG CGC TTC AAC GCC AAG TAC CCG		686
Glu Ser Leu Asn Ser Glu Gly Ala Ala Arg Phe Asn Ala Lys Tyr Pro		
160	165	170
CAG GGC ATC CCC ACC TCG GCC TGC GGC GAA GGC GCC TAC AAG GTC AAC		734
Gln Gly Ile Pro Thr Ser Ala Cys Gly Glu Gly Ala Tyr Lys Val Asn		
180	185	190
GGC GTG AGC TAT TAC TCC TGG AGC GGT TCC TCG CCG CTG ACC AAC TTC		782

Gly Val Ser Tyr Tyr Ser Trp Ser Gly Ser Ser Pro Leu Thr Asn Phe			
195	200	205	
CTC GAT CCG AGC GAC GCC TTC CTC GGC GCC TCG TCG CTG ACC TTC AAG 830			
Leu Asp Pro Ser Asp Ala Phe Leu Gly Ala Ser Ser Leu Thr Phe Lys			
210	215	220	
AAC GGC ACC GCC AAC GAC GGC CTG GTC GGC ACC TGC AGT TCG CAC CTG 878			
Asn Gly Thr Ala Asn Asp Gly Leu Val Gly Thr Cys Ser Ser His Leu			
225	230	235	
AGC ATG GTG ATC CGC GAC AAC TAC CGG ATG AAC CAC CTG GAC GAG GTG 926			
Gly Met Val Ile Arg Asp Asn Tyr Arg Met Asn His Leu Asp Glu Val			
240	245	250	255
AAC CAG GTC TTC GGC CTC ACC AGC CTG TTC GAG ACC AGC CCG GTC AGC 974			
Asn Gln Val Phe Gly Leu Thr Ser Leu Phe Glu Thr Ser Pro Val Ser			
260	265	270	
GTC TAC CGC CAG CAC GCC AAC CGC CTG AAG AAC GCC AGC CTG 1016			
Val Tyr Arg Gln His Ala Asn Arg Leu Lys Asn Ala Ser Leu			
275	280	285	
TAGGACCCCG GCCGGGGCCT CGGCCCGGGC C 1047			

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 311 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

Met Lys Lys Lys Ser Leu Leu Pro Leu Gly Leu Ala Ile Gly Leu Ala
 -26 -25 -20 -15
 Ser Leu Ala Ala Ser Pro Leu Ile Gln Ala Ser Thr Tyr Thr Gln Thr
 -10 -5 1 5
 Lys Tyr Pro Ile Val Leu Ala His Gly Met Leu Gly Phe Asp Asn Ile
 10 15 20
 Leu Gly Val Asp Tyr Trp Phe Gly Ile Pro Ser Ala Leu Arg Arg Asp
 25 30 35
 Gly Ala Gln Val Tyr Val Thr Glu Val Ser Gln Leu Asp Thr Ser Glu
 40 45 50
 Val Arg Gly Glu Gln Leu Leu Gln Gln Val Glu Glu Ile Val Ala Leu
 55 60 65 70
 Ser Gly Gln Pro Lys Val Asn Leu Ile Gly His Ser His Gly Pro
 75 80 85
 Thr Ile Arg Tyr Val Ala Ala Val Arg Pro Asp Leu Ile Ala Ser Ala
 90 95 100
 Thr Ser Val Gly Ala Pro His Lys Gly Ser Asp Thr Ala Asp Phe Leu
 105 110 115
 Arg Gln Ile Pro Pro Gly Ser Ala Gly Glu Ala Val Leu Ser Gly Leu
 120 125 130
 Val Asn Ser Leu Gly Ala Leu Ile Ser Phe Leu Ser Ser Gly Ser Thr
 135 140 145 150
 Gly Thr Gln Asn Ser Leu Gly Ser Leu Glu Ser Leu Asn Ser Glu Gly
 155 160 165

Ala Ala Arg Phe Asn Ala Lys Tyr Pro Gln Gly Ile Pro Thr Ser Ala
170 175 180

Cys Gly Glu Gly Ala Tyr Lys Val Asn Gly Val Ser Tyr Tyr Ser Trp
185 190 195

Ser Gly Ser Ser Pro Leu Thr Asn Phe Leu Asp Pro Ser Asp Ala Phe
200 205 210

Leu Gly Ala Ser Ser Leu Thr Phe Lys Asn Gly Thr Ala Asn Asp Gly
215 220 225 230

Leu Val Gly Thr Cys Ser Ser His Leu Gly Met Val Ile Arg Asp Asn
235 240 245

Tyr Arg Met Asn His Leu Asp Glu Val Asn Gln Val Phe Gly Leu Thr
250 255 260

Ser Leu Phe Glu Thr Ser Pro Val Ser Val Tyr Arg Gln His Ala Asn
265 270 275

Arg Leu Lys Asn Ala Ser Leu
280 285

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung und Identifizierung von Hydrolase-Mutanten mit verbesserten Eigenschaften hinsichtlich Stereo- oder Regioselektivität, katalytischer Aktivität oder Stabilität, dadurch gekennzeichnet, daß
 - a) ein Ausgangs-Hydrolasegen mittels einer modifizierten Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mutagenisiert wird, wobei durch Einstellen der Mg^{2+} -, Mn^{2+} - und der Desoxynucleotid-Konzentrationen sowie der Einstellung der Zyklenanzahl die Mutationsfrequenz und Gesamtanzahl der Mutationen in der amplifizierten DNA eingestellt wird und/oder
 - b) ein oder mehrere Ausgangs-Hydrolasegene, ein oder mehrere gemäß Schritt a) mutierte Hydrolasegene oder Gemische von einem oder mehreren Ausgangs-Hydrolasegenen und einem oder mehreren gemäß Schritt a) mutierten Hydrolasegenen durch enzymatische Fragmentierung dieser Gene und nachfolgender enzymatischer Reassemblierung der entstandenen Fragmente zu vollständig rekombinierten Hydrolasegenen mutagenisiert werden,
 - c) die gemäß Schritt a) oder b) erhaltenen mutierten Hydrolasegene in einen Wirtsorganismus transformiert werden und
 - d) Hydrolase-Mutanten mit verbesserten Eigenschaften, die von in Schritt c) erhaltenen Transformanten exprimiert werden, durch ein Testverfahren identifiziert werden.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei in Schritt a) bei der PCR durch Einstellen der Mg^{2+} -, Mn^{2+} - und der Desoxynucleotid-Konzentration eine durchschnittliche Mutationsfrequenz von 1-2 Basenaustauschen bezogen auf das zu mutagenisierende Hydrolasegen eingestellt wird.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei in Schritt a) als Ausgangs-Hydrolasegen ein in einer zuvor gemäß Anspruch 1 durchgeführten PCR mutagenisiertes Hydrolasegen eingesetzt wird.

4. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei in Schritt b) die enzymatische Fragmentierung der Hydrolasegene mit einer Desoxyribonuclease durchgeführt wird.
5. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei in Schritt b) die Reassemblierung der Fragmente enzymatisch mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase unter Verwendung eines zyklischen Temperaturprogrammes, in welchem die Parameter Temperatur und Zyklendauer eingestellt werden, durchgeführt wird.
6. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei in Schritt b) während der enzymatischen Reassemblierung durch Einstellen der Mg²⁺-, Mn²⁺- und der Desoxynucleotidkonzentration die Mutationsfrequenz eingestellt wird.
7. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei in Schritt b) die vollständig rekombinierten Hydrolasegene nach Beendigung der Reassemblierungsreaktion durch eine Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert werden.
8. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei in Schritt b) entweder aus Schritt a) gemäß Anspruch 1 oder 2 erhaltene modifizierte Hydrolasegene oder mehrere gemäß Anspruch 3 mutagenisierte Hydrolasegene der Fragmentierung und Reassemblierung unterworfen werden.
9. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei in Schritt b) zur Reassemblierung zusätzlich synthetisch hergestellte Genfragmente eingesetzt werden.
10. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei in Schritt b) zur Reassemblierung Hydrolasegen-Fragmente aus unterschiedlichen Organismen eingesetzt werden können, die eine Sequenzhomologie von mindestens 60% zueinander besitzen.
11. Verfahren gemäß Anspruch 2 oder 6, wobei die Hydrolase-Mutanten Lipase- oder Esterasemutanten sind und die Konzentration der Magnesium-Ionen 1,5 bis 8,0 mM, bevorzugt 5,8 bis 6,4 mM ist und die Konzentration der Mangan-Ionen 0,0 bis 3,0 mM, bevorzugt < 0,3 mM ist.

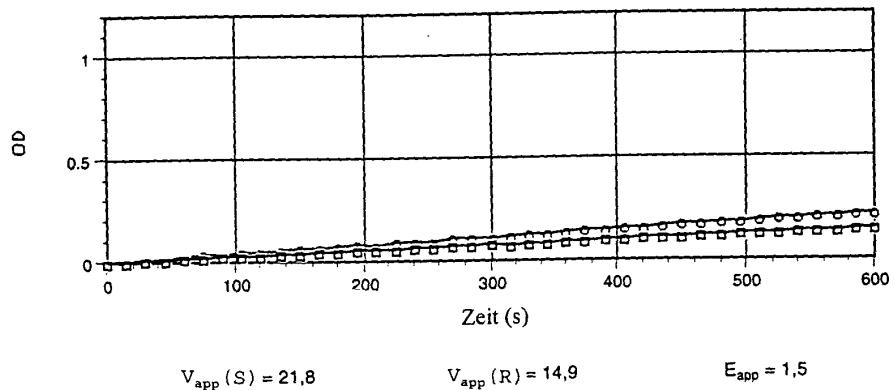
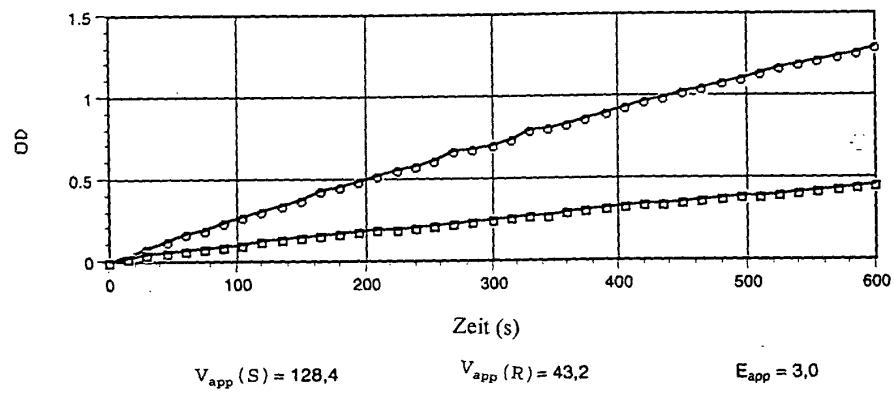
12. Verfahren gemäß Anspruch 2 oder 6, wobei die Hydrolase-Mutanten Lipase- oder Esterasemutanten sind und die Konzentration der Desoxynucleotidtriphosphate 0,05 mM bis 1,0 mM, bevorzugt 0,2 mM beträgt.
13. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei in Schritt d) zum Test auf Stereo- oder Regioselektivität der Hydrolase-Mutanten ein Testsubstrat mit einer chromophoren Gruppe versehen ist, die nach der Abspaltung durch den Katalysator eine Änderung der Absorption oder Emission hervorruft, die spektrometrisch bestimmt wird und die reinen Stereo- oder Regioisomeren des Testsubstrates in getrennten Testgefäßen mit gleichen Mengen der Hydrolase-Mutanten versetzt werden und die Stereo- oder Regioselektivität aus dem Verhältnis der erhaltenen linearen Anfangsgeschwindigkeiten der Reaktionen bestimmt werden kann.
14. Verfahren gemäß Anspruch 13, wobei als Testsubstrat die Stereo- oder Regioisomeren einer Verbindung mit einer über eine Carbonsäureester- oder Carbonsäureamid-Bindung gebundene, UV/VIS-aktive oder fluoreszenzaktive Molekülgruppe eingesetzt werden.
15. Verfahren gemäß Anspruch 14, wobei die UV/VIS-aktive Molekülgruppe ein p-Nitrophenyl-Rest ist.
16. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei in Schritt d) der Test auf Stereo- oder Regioselektivität über die Bestimmung der zeitlichen Konzentrationsänderung von freien Fettsäuren oder Bernsteinsäure erfolgt, wobei die entsprechenden stereo- oder regioisomeren Carbonsäureester oder -amide mit Hilfe der Hydrolase-Mutanten in getrennten Gefäßen zu freien Fettsäuren oder Bernsteinsäure hydrolysiert werden.
17. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei in Schritt d) der Test auf Stereo- oder Regioselektivität über die Messung der Radioaktivität erfolgt, wobei die Hydrolase-Mutanten mit in einer funktionellen Gruppe unterschiedlich radioaktiv markierten Stereo- oder Regioisomeren umgesetzt werden und wobei das Gemisch der Stereo- oder Regioisomeren trägerfixiert ist.

18. Verfahren gemäß Anspruch 17, wobei eines der Stereo- oder Regioisomere des an den Träger gebundenen Gemisches der isomeren Verbindung mit dem Radioisotop ^3H und das andere Stereoisomer mit dem Radioisotop ^{14}C markiert ist.
19. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei in Schritt d) der Test auf Stereoselektivität über die kapillarelektrophoretische Bestimmung der Reaktionsprodukte und -edukte einer Testreaktion erfolgt, wobei die Trennung der stereoisomeren Reaktionsprodukte und -edukte in chiral-modifizierten Kapillaren durchgeführt wird.
20. Verfahren gemäß Anspruch 13 bis 19, wobei mehrere Reaktionen parallel in Mikrotiterplatten durchgeführt werden.
21. Hydrolase-Mutanten erhältlich durch ein Verfahren gemäß Anspruch 1 bis 20.
22. Hydrolase-Mutanten gemäß Anspruch 21, die Lipase-Mutanten sind.
23. Hydrolase-Mutanten gemäß Anspruch 21, die Esterase-Mutanten sind.
24. Hydrolase-Mutanten gemäß Anspruch 22, die Lipase-Mutanten der Ausgangs-Lipase aus dem Stamm *P. aeruginosa* sind.
25. Hydrolase-Mutante gemäß Anspruch 24, die durch Exprimieren der Transormanten P1B 01-E4 (DSM 11658), P2B 08-H3 (DSM 11659) oder P3B 13-D10 (DSM 11660) erhältlich ist.
26. Hydrolase-Mutanten gemäß Anspruch 24, die die Aminosäuresequenz der in SEQ ID NOs 4, 6, 8 und 10 gezeigten reifen Proteine aufweisen.
27. Verfahren zum Test von Katalysatoren auf Stereo- oder Regioselektivität, wobei ein Testsubstrat mit einer chromophoren Gruppe versehen ist, die nach der Abspaltung durch den Katalysator eine Änderung

der Absorption oder Emission hervorruft, die spektrometrisch bestimmt wird und die reinen Stereo- oder Regioisomeren des Testsubstrates in getrennten Testgefäßen mit gleichen Mengen des Katalysators versetzt werden und die Stereo- oder Regioselektivität aus dem Verhältnis der erhaltenen linearen Anfangsgeschwindigkeiten der Reaktionen bestimmt werden kann.

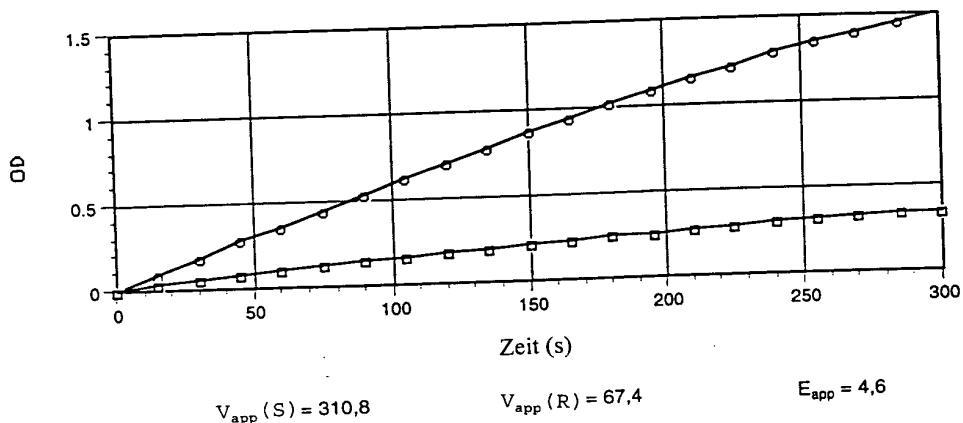
Zusammenfassung:

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung und Identifizierung von Hydrolase-Mutanten mit verbesserten Eigenschaften hinsichtlich der Stereo- oder Regioselektivität, katalytischen Aktivität oder Stabilität bei chemischen Umsetzungen.

Fig. 1WildtypP1B01-E4

1/2

P2B08-H3



P3B13-D10

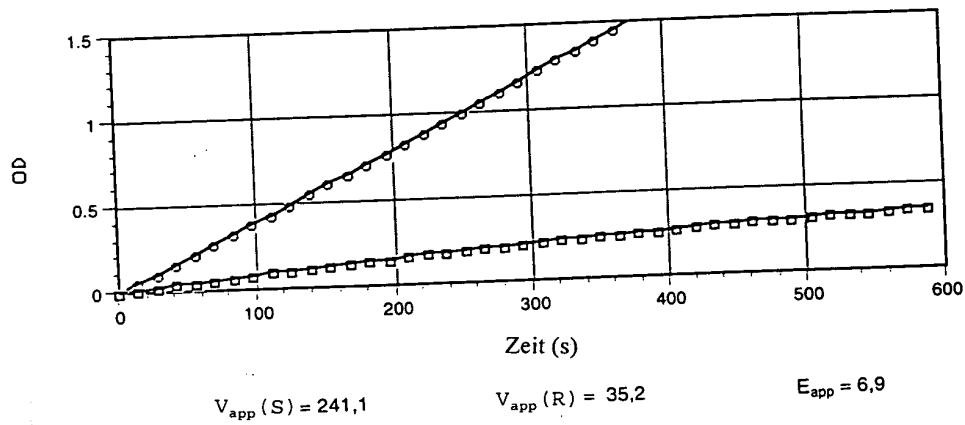


Fig. 2

10	20	30	
GGATCCCC	GGTTCTCCGGAAAGGATTTCGG		01-H1
GGATCCCC	GGTTCTCCGGAAAGGATTTCGG		01-E4
GGATCCCC	GGTTCTCCGGAAAGGATTTCGG		08-H3
GGATCCCC	GGTTCTCCGGAAAGGATTTCGG		13-D10
GGATCCCC	GGTTCTCCGGAAAGGATTTCGG		WT
40	50	60	
GCGATGGCTGGCAGGGACGCGCC	CGCCCTCGGCC		01-H1
GCGATGGCTGGCAGGGACGCGCC	CGCCCTCGGCC		01-E4
GCGATGGCTGGCAGGGACGCGCC	CGCCCTCGGCC		08-H3
GCGATGGCTGGCAGGGACGCGCC	CGCCCTCGGCC		13-D10
GCGATGGCTGGCAGGGACGCGCC	CGCCCTCGGCC		WT
70	80	r start	90
CCATCAACCTGAGATGAGAACAA	ACATGAA	G	01-H1
CCATCAACCTGAGATGAGAACAA	ACATGAA	G	01-E4
CCATCAACCTGAGATGAGAACAA	ACATGAA	G	08-H3
CCATCAACCTGAGATGAGAACAA	ACATGAA	G	13-D10
CCATCAACCTGAGATGAGAACAA	ACATGAA	G	WT
100	110	r	
AAGAAGTCTGCTCC	CCCTCGGGCTGGCC		01-H1
AAGAAGTCTGCTCC	CCCTCGGGCTGGCC		01-E4
AAGAAGTCTGCTCC	CCCTCGGGCTGGCC		08-H3
AAGAAGTCTGCTCC	CCCTCGGGCTGGCC		13-D10
AAGAAGTCTGCTCC	CCCTCGGGCTGGCC		WT
130	140	150	
ATCGGGTCTCGCCTCTCTCGCTG	CCAGGCC	T	01-H1
ATCGGGTCTCGCCTCTCTCGCTG	CCAGGCC	T	01-E4
ATCGGGTCTCGCCTCTCTCGCTG	CCAGGCC	T	08-H3
ATCGGGTCTCGCCTCTCTCGCTG	CCAGGCC	T	13-D10
ATCGGGTCTCGCCTCTCTCGCTG	CCAGGCC	T	WT
160	170	180	
CTGATCCAGGCCAGCACCTAACAC	CCAGACC	C	01-H1
CTGATCCAGGCCAGCACCTAACAC	CCAGACC	C	01-E4
CTGATCCAGGCCAGCACCTAACAC	CCAGACC	C	08-H3
CTGATCCAGGCCAGCACCTAACAC	CCAGACC	C	13-D10
CTGATCCAGGCCAGCACCTAACAC	CCAGACC	C	WT

	190	200	210	
A A A T A C C C C A T C G T G C T G G C C C A C G G G C A T G				01-H1
A A A T A C C C C A T C G T G C T G G C C C A C G G G C A T G				01-E4
A A A T A C C C C A T C G T G C T G G C C C A C G G G C A T G				08-H3
A A A T A C C C C A T C G T G C T G G C C C A C G G G C A T G				13-D10
A A A T A C C C C A T C G T G C T G G C C C A C G G G C A T G			WT	

	220	230	240	
C T C G G G C T T C G A C A A C A T C C T C G G G G T C G A C				01-H1
C T C G G G C T T C G A C A A C A T C C T C G G G G T C G A C				01-E4
C T C G G G C T T C G A C A A C A T C C T C G G G G T C G A C				08-H3
C T C G G G C T T C G A C A A C A T C C T C G G G G T C G A C				13-D10
C T C G G G C T T C G A C A A C A T C C T C G G G G T C G A C			WT	

	250	260	270	
T A C T G G T T C G G C A T T C C C A G G C G C C T T G C G C				01-H1
T A C T G G T T C G G C A T T C C C A G G C G C C T T G C G C				01-E4
T A C T G G T T C G G C A T T C C C A G G C G C C T T G C G C				08-H3
T A C T G G T T C G G C A T T C C C A G G C G C C T T G C G C				13-D10
T A C T G G T T C G G C A T T C C C A G G C G C C T T G C G C			WT	

	280	290	300	
C G T G A C G G G T G C C C A G G G T C T A C G T C A C C G A A				01-H1
C G T G A C G G G T G C C C A G G G T C T A C G T C A C C G A A				01-E4
C G T G A C G G G T G C C C A G G G T C T A C G T C A C C G A A				08-H3
C G T G A C G G G T G C C C A G G G T C T A C G T C A C C G A A				13-D10
C G T G A C G G G T G C C C A G G G T C T A C G T C A C C G A A			WT	

	310	320	330	
G T C A G C C A G T T G G A C A C C T C G G A A G T C C G C				01-H1
G T C A G C C A G T T G G A C A C C T C G G A A G T C C G C				01-E4
G T C A G C C A G T T G G A C A C C T C G G A A G T C C G C				08-H3
G T C A G C C A G T T G G A C A C C T C G G A A G T C C G C				13-D10
G T C A G C C A G T T G G A C A C C T C G G A A G T C C G C			WT	

	340	350	360	
G G C G A G C A G T T G C T G C A A C A G G T G G A G G A A				01-H1
G G C G A G C A G T T G C T G C A A C A G G T G G A G G A A				01-E4
G G C G A G C A G T T G C T G C A A C A G G T G G A G G A A				08-H3
G G C G A G C A G T T G C T G C A A C A G G T G G A G G A A				13-D10
G G C G A G C A G T T G C T G C A A C A G G T G G A G G A A			WT	

370	380	390	
A T C G T C G C C C T C A G C G G G C C A G C C C A A G G T C			01-H1
A T C G T C G C C C T C A G C G G G C C A G C C C A A G G T C			01-E4
A T C G T C G C C C T C A G C G G G C C A G C C C A A G G T C			08-H3
A T C G T C G C C C T C A G C G G G C C A G C C C A A G G T C			13-D10
A T C G T C G C C C T C A G C G G G C C A G C C C A A G G T C			WT
400	410	420	
A A C C T G A T C G G C C A C A G C C A C G G G C G G G C C G			01-H1
A A C C T G A T C G G C C A C A G C C A C G G G C G G G C C G			01-E4
A A C C T G A T C G G C C A C A G C C A C G G G C G G G C C G			08-H3
A A C C T G A T C G G C C A C A G C C A C G G G C G G G C C G			13-D10
A A C C T G A T C G G C C A C A G C C A C G G G C G G G C C G			WT
430	440	450	
A C C A T C C G C T A C G T C G C C G C C G T A C G T C C C			01-H1
A C C A T C C G C T A C G T C G C C G C C G T A C G T C C C			01-E4
A C C A T C C G C T A C G T C G C C G C C G T A C G T C C C			08-H3
A C C A T C C G C T A C G T C G C C G C C G T A C G T C C C			13-D10
A C C A T C C G C T A C G T C G C C G C C G T A C G T C C C			WT
460	470	480	
G A C C T G A T C G C T T C C G C C A [REDACTED] C A G C G T C G G C			01-H1
G A C C T G A T C G C T T C C G C C A C C A G C G T C G G C			01-E4
G A C C T G A T C G C T T C C G C C A C C A G C G T C G G C			08-H3
G A C C T G A T C G C T T C C G C C A C C A G C G T C G G C			13-D10
G A C C T G A T C G C T T C C G C C A C C A G C G T C G G C			WT
490	500	510	
G C C C C G C A C A A G G G T T C G G A C A C C G G C C G A C			01-H1
G C C C C G C A C A A G G G T T C G G A C A C C G G C C G A C			01-E4
G C C C C G C A C A A G G G T T C G G A C A C C G G C C G A C			08-H3
G C C C C G C A C A A G G G T T C G G A C A C C G G C C G A C			13-D10
G C C C C G C A C A A G G G T T C G G A C A C C G G C C G A C			WT
520	530	540	
T T C C T G C G C C A G A T C C C A C C G G G T T C G G C C			01-H1
T T C C T G C G C C A G A T C C C A C C G G G T T C G G C C			01-E4
T T C C T G C G C C A G A T C C C A C C G G G T T C G G C C			08-H3
T T C C T G C G C C A G A T C C C A C C G G G T T C G G C C			13-D10
T T C C T G C G C C A G A T C C C A C C G G G T T C G G C C			WT

550	560	570	
G G C G A G G C A G T C C T C T C C G G G C T G G T C A A C			01-H1
G G C G A G G C A G T C C T C T C C G G G C T G G T C A A C			01-E4
G G C G A G G C A G T C C T C T C C G G G C T G G T C A A C			08-H3
G G C G A G G C A G T C C T C T C C G G G C T G G T C A A C			13-D10
G G C G A G G C A G T C C T C T C C G G G C T G G T C A A C			WT
580	590	600	
A G C C T C G G C G C G C T G A T C A G C T T C C T T T C C			01-H1
A G C C T C G G C G C G C T G A T C A G C T T C C T T T C C			01-E4
A G C C T C G G C G C G C T G A T C A G C T T C C T T T C C			08-H3
A G C C T C G G C G C G C T G A T C A G C T T C C T T T C C			13-D10
A G C C T C G G C G C G C T G A T C A G C T T C C T T T C C			WT
610	620	630	
A G C G G C G G C A C C G G T A C G C A G A A T T C A C T G			01-H1
A G C G G C G G C A C C G G T A C G C A G A A T T C A C T G			01-E4
A G C G G C G G C A C C G G T A C G C A G A A T T C A C T G			08-H3
A G C G G C G G C A C C G G T A C G C A G A A T T C A C T G			13-D10
A G C G G C A G C A C C G G T A C G C A G A A T T C A C T G			WT
640	650	660	
G G C T C G C T G G A G T C G C T G A A C A G C G A G G G T			01-H1
G G C T C G C T G G A G T C G C T G A A C A G C G A G G G T			01-E4
G G C T C G C T G G A G T C G C T G A A C A G C G A G G G T			08-H3
G G C T C G C T G G A G T C G C T G A A C A G C G A G G G T			13-D10
G G C T C G C T G G A G T C G C T G A A C A G C G A G G G T			WT
670	680	690	
G C C G C G C G C T T C A A C G C C A A G T A C C C G C A G			01-H1
G C C G C G C G C T T C A A C G C C A A G T A C C C G C A G			01-E4
G C C G C G C G C T T C A A C G C C A A G T A C C C G C A G			08-H3
G C C G C G C G C T T C A A C G C C A A G T A C C C G C A G			13-D10
G C C G C G C G C T T C A A C G C C A A G T A C C C G C A G			WT
700	710	720	
G G C A T C C C C A C C T C G G C C T G C G G C G A A G G C			01-H1
G G C A T C C C C A C C T C G G C C T G C G G C G A A G G C			01-E4
G G C A T C C C C A C C T C G G C C T G C G G C G A A G G C			08-H3
G G C A T C C C C A C C T C G G C C T G C G G C G A A G G C			13-D10
G G C A T C C C C A C C T C G G C C T G C G G C G A A G G C			WT

730	740	750	
G C C T A C A A G G T C A A C G G G C G T G A G C T A T T A C			01-H1
G C C T A C A A G G T C A A C G G G C G T G A G C T A T T A C			01-E4
G C C T A C A A G G T C A A C G G G C G T G A G C T A T T A C			08-H3
G C C T A C A A G G T C A A C G G G C G T G A G C T A T T A C			13-D10
G C C T A C A A G G T C A A C G G G C G T G A G C T A T T A C			WT
760	770	780	
T C C T G G A G C G G T T C C T C G C C G C T G A C C A A C			01-H1
T C C T G G A G C G G T T C C T C G C C G C T G A C C A A C			01-E4
T C C T G G A G C G G T T C C T C G C C G C T G A C C A A C			08-H3
T C C T G G A G C G G T T C C T C G C C G C T G A C C A A C			13-D10
T C C T G G A G C G G T T C C T C G C C G C T G A C C A A C			WT
790	800	810	
T T C C T C G A T C C G A G C G A C G C C T T C C T C G G C			01-H1
T T C C T C G A T C C G A G C G A C G C C T T C C T C G G C			01-E4
T T C C T C G A T C C G A G C G A C G C C T T C C T C G G C			08-H3
T T C C T C G A T C C G A G C G A C G C C T T C C T C G G C			13-D10
T T C C T C G A T C C G A G C G A C G C C T T C C T C G G C			WT
820	830	840	
G C C T C G T C G C T G A C C T T C A A G A A C G G G C A C C			01-H1
G C C T C G T C G C T G A C C T T C A A G A A C G G G C A C C			01-E4
G C C T C G T C G C T G A C C T T C A A G A A C G G G C A C C			08-H3
G C C T C G T C G C T G A C C T T C A A G A A C G G G C A C C			13-D10
G C C T C G T C G C T G A C C T T C A A G A A C G G G C A C C			WT
850	860	870	
G C C A A C G A C G G C C T G G T C G G C A C C T G C A G T			01-H1
G C C A A C G A C G G C C T G G T C G G C A C C T G C A G T			01-E4
G C C A A C G A C G G C C T G G T C G G C A C C T G C A G T			08-H3
G C C A A C G A C G G C C T G G T C G G C A C C T G C A G T			13-D10
G C C A A C G A C G G C C T G G T C G G C A C C T G C A G T			WT
880	890	900	
T C G C A C C T G G G C A T G G T G A T C C G C G A C A A C			01-H1
T C G C A C C T G G G C A T G G T G A T C C G C G A C A A C			01-E4
T C G C A C C T G G G C A T G G T G A T C C G C G A C A A C			08-H3
T C G C A C C T G G G C A T G G T G A T C C G C G A C A A C			13-D10
T C G C A C C T G G G C A T G G T G A T C C G C G A C A A C			WT

910	920	930	
T A C C G G A T G A A C C A C C T G G A C G A G G T G A A C			01-H1
T A C C G G A T G A A C C A C C T G G A C G A G G T G A A C			01-E4
T A C C G G A T G A A C C A C C T G G A C G A G G T G A A C			08-H3
T A C C G G A T G A A C C A C C T G G A C G A G G T G A A C			13-D10
T A C C G G A T G A A C C A C C T G G A C G A G G T G A A C			WT

940	950	960	
C A G G T C T T C G G G C T C A C C A G C C T G T T C G A G			01-H1
C A G G T C T T C G G G C T C A C C A G C C T G T T C G A G			01-E4
C A G G T C T T C G G G C T C A C C A G C C T G T T C G A G			08-H3
C A G G T C T T C G G G C T C A C C A G C C T G T T C G A G			13-D10
C A G G T C T T C G G G C T C A C C A G C C T G T T C G A G			WT

970	980	990	
A C C A G C C C G G T C A G C G T C T A C C G C C A G C A C			01-H1
A C C A G C C C G G T C A G C G T C T A C C G C C A G C A C			01-E4
A C C A G C C C G G T C A G C G T C T A C C G C C A G C A C			08-H3
A C C A G C C C G G T C A G C G T C T A C C G C C A G C A C			13-D10
A C C A G C C C G G T C A G C G T C T A C C G C C A G C A C			WT

1000	1010	1 stop 1020	
G C C A A C C G G C C T G A A G A A C G C C A G C C T G T A G			01-H1
G C C A A C C G G C C T G A A G A A C G C C A G C C T G T A G			01-E4
G C C A A C C G G C C T G A A G A A C G C C A G C C T G T A G			08-H3
G C C A A C C G G C C T G A A G A A C G C C A G C C T G T A G			13-D10
G C C A A C C G G C C T G A A G A A C G C C A G C C T G T A G			WT

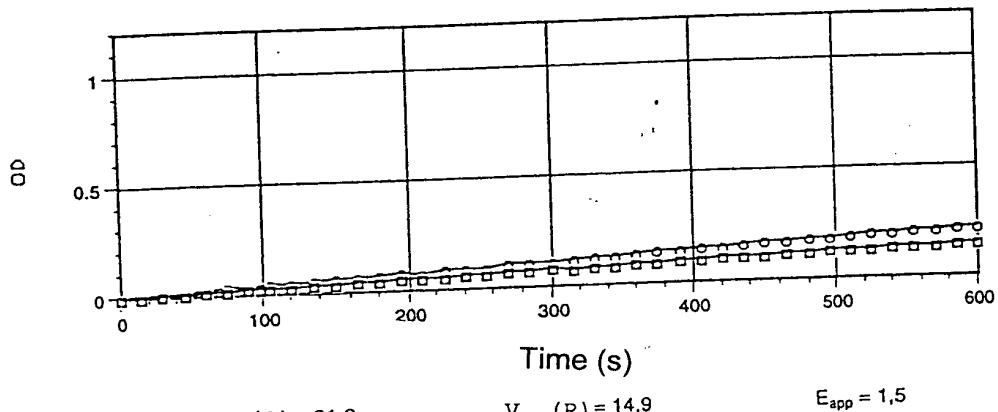
1030	1040	
G A C C C C G G C C G G G C T C G G C C C G G G C C C		01-H1
G A C C C C G G C C G G G C C T C G G C C C G G G C C C		01-E4
G A C C C C G G C C G G G C C T C G G C C C G G G C C C		08-H3
G A C C C C G G C C G G G C C T C G G C C C G G G C C C		13-D10
G A C C C C G G C C G G G C C T C G G C C C G G G C C C		WT

09/463494

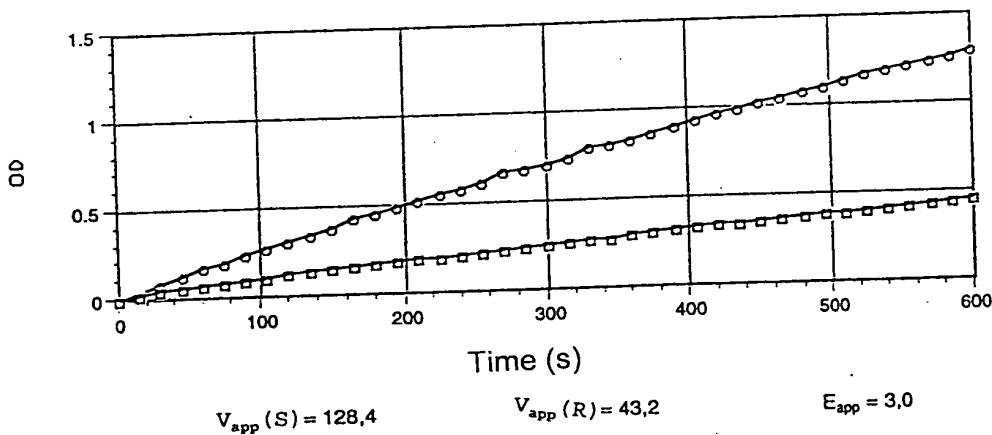
1/13

Fig. 1

Wild type



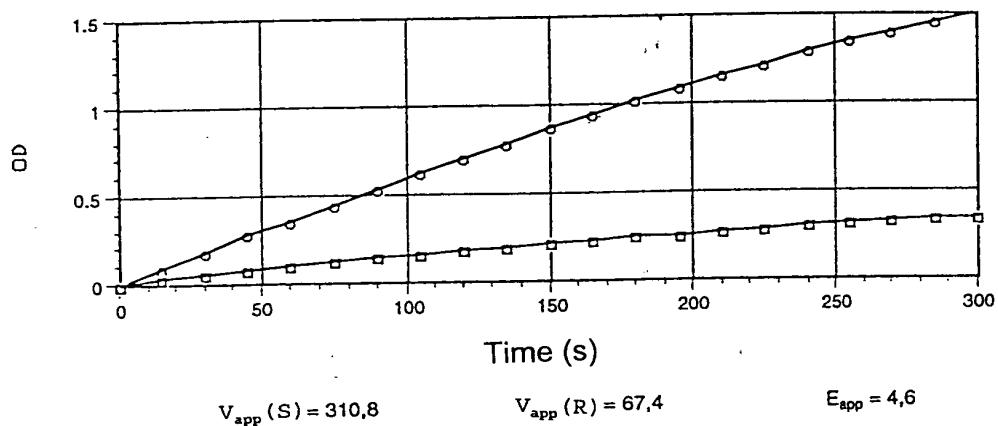
P1B 01-E4



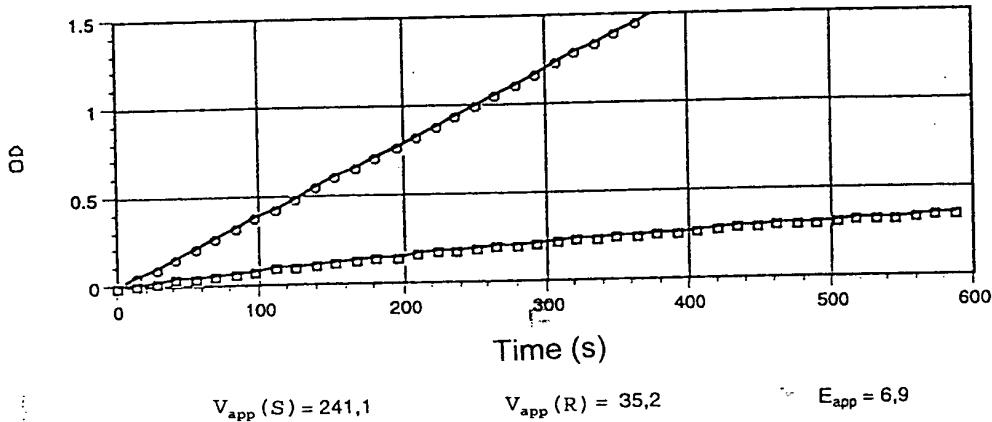
09/463494

2/13

P2B 08-H3



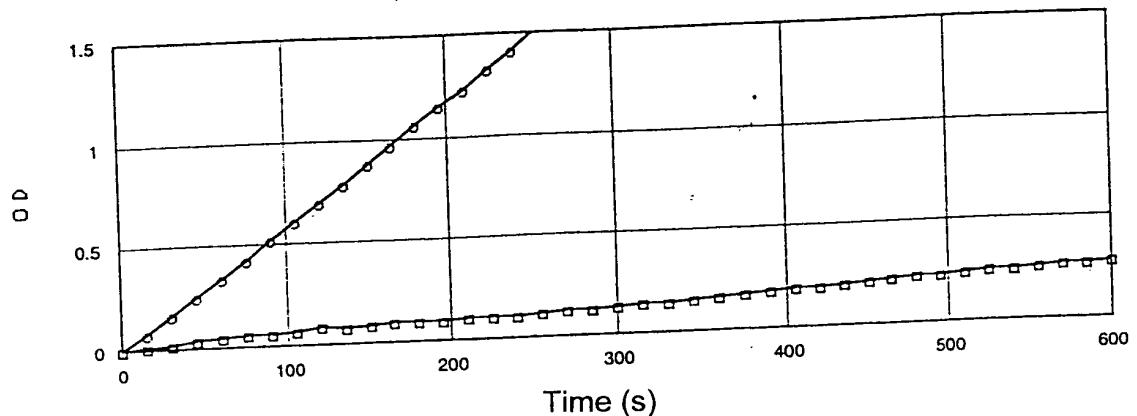
P3B 13-D10



09/09/09 09/463494

3/13

P4B 04-H3

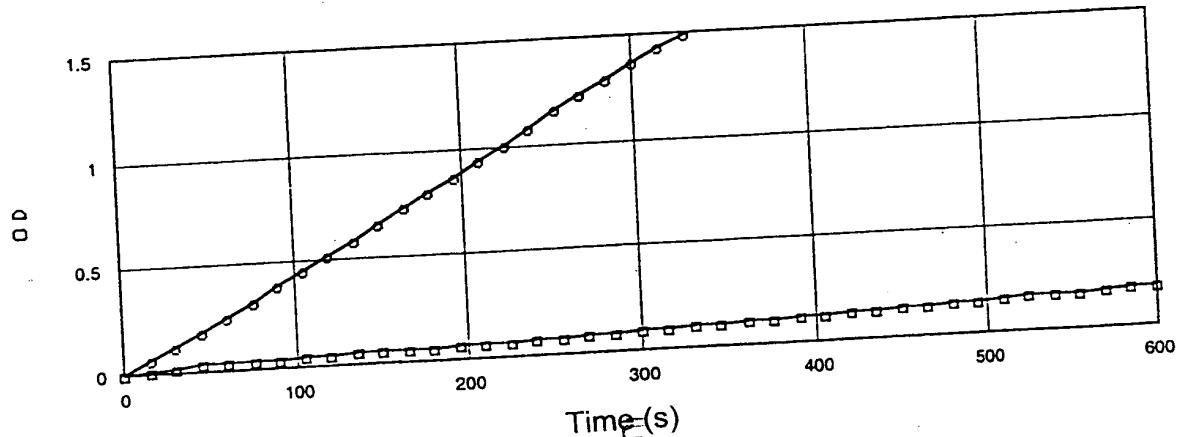


$$V_{app} (S) = 355,6$$

$$V_{app} (R) = 26,5$$

$$E_{app} = 13,4$$

P5B 14-C11



$$V_{app} (S) = 275,9$$

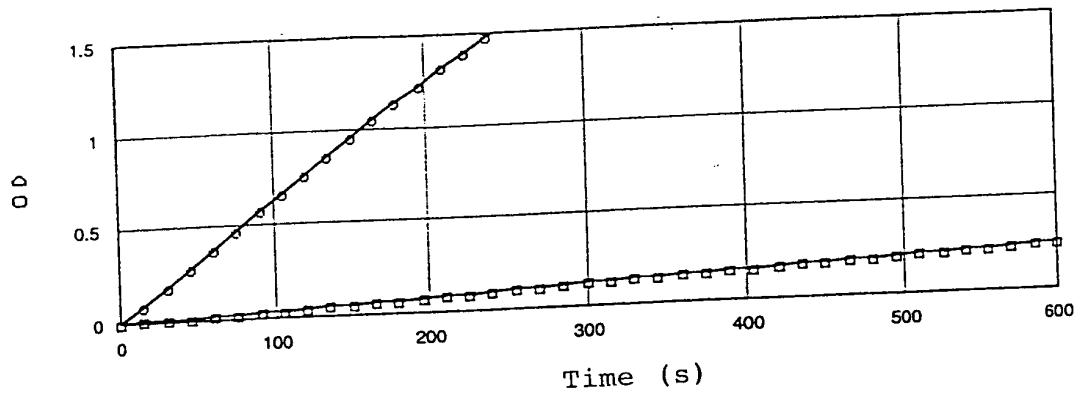
$$V_{app} (R) = 17,3$$

$$E_{app} = 15,9$$

09/463494

4/13

P4BSF 03-G10



$$V_{app} (S) = 384,7$$

$$V_{app} (R) = 25,3$$

$$E_{app} = 15,2$$

09/463494

5/13

Fig. 2

Wild type	10											
P1B 01-H1	G	G	A	T	C	C	C	C	-	G	G	19
P1B 01-E4	G	G	A	T	C	C	C	C	G	G	T	20
P2B 08-H3	G	G	A	T	C	C	C	C	G	G	T	20
P3B 13-D10	G	G	A	T	C	C	C	C	G	G	T	20
P4B 04-H3	G	G	A	T	C	C	C	C	G	G	T	20
PSB 14-C11	G	G	A	T	C	C	C	C	G	G	T	20
P4BSF 03-G10	G	G	A	T	C	C	C	C	G	G	T	20
Wild type	20											
P1B 01-H1	A	A	G	G	A	T	T	C	G	G	C	39
P1B 01-E4	A	A	G	G	A	T	T	C	G	G	C	40
P2B 08-H3	A	A	G	G	A	T	T	C	G	G	C	40
P3B 13-D10	A	A	G	G	A	T	T	C	G	G	C	40
P4B 04-H3	A	A	G	G	A	T	T	C	G	G	C	40
PSB 14-C11	A	A	G	G	A	T	T	C	G	G	C	40
P4BSF 03-G10	A	A	G	G	A	T	T	C	G	G	C	40
Wild type	40											
P1B 01-H1	G	C	A	G	G	A	C	G	C	G	C	59
P1B 01-E4	G	C	A	G	G	A	C	G	C	G	C	60
P2B 08-H3	G	C	A	G	G	A	C	G	C	G	C	60
P3B 13-D10	G	C	A	G	G	A	C	G	C	G	C	60
P4B 04-H3	G	C	A	G	G	A	C	G	C	G	C	60
PSB 14-C11	G	C	A	G	G	A	C	G	C	G	C	60
P4BSF 03-G10	G	C	A	G	G	A	C	G	C	G	C	60
Wild type	60											
P1B 01-H1	C	C	A	T	C	A	A	C	C	T	G	79
P1B 01-E4	C	C	A	T	C	A	A	C	C	T	G	80
P2B 08-H3	C	C	A	T	C	A	A	C	C	T	G	80
P3B 13-D10	C	C	A	T	C	A	A	C	C	T	G	80
P4B 04-H3	C	C	A	T	C	A	A	C	C	T	G	80
PSB 14-C11	C	C	A	T	C	A	A	C	C	T	G	80
P4BSF 03-G10	C	C	A	T	C	A	A	C	C	T	G	80
Wild type	80											
P1B 01-H1	C	A	A	C	A	T	G	A	G	A	G	99
P1B 01-E4	C	A	A	C	A	T	G	A	G	A	G	100
P2B 08-H3	C	A	A	C	A	T	G	A	G	A	G	100
P3B 13-D10	C	A	A	C	A	T	G	A	G	A	G	100
P4B 04-H3	C	A	A	C	A	T	G	A	G	A	G	100
PSB 14-C11	C	A	A	C	A	T	G	A	G	A	G	100
P4BSF 03-G10	C	A	A	C	A	T	G	A	G	A	G	100
Wild type	100											
P1B 01-H1	T	G	C	T	C	C	C	C	T	C	G	119
P1B 01-E4	T	G	C	T	C	C	C	C	T	C	G	120
P2B 08-H3	T	G	C	T	C	C	C	C	T	C	G	120
P3B 13-D10	T	G	C	T	C	C	C	C	T	C	G	120
P4B 04-H3	T	G	C	T	C	C	C	C	T	C	G	120
PSB 14-C11	T	G	C	T	C	C	C	C	T	C	G	120
P4BSF 03-G10	T	G	C	T	C	C	C	C	T	C	G	120

09/463494

6/13

	120	130	
Wild type			
P1B 01-H1	A T C G G G T C T C G C C C T C T C T C T C G C	139	
P1B 01-E4	A T C G G G T C T C G C C C T C T C T C T C G C	140	
P2B 08-H3	A T C G G G T C T C G C C C T C T C T C T C G C	140	
P3B 13-D10	A T C G G G T C T C G C C C T C T C T C T C G C	140	
P4B 04-H3	A T C G G G T C T C G C C C T C T C T C T C G C	140	
P5B 14-C11	A T C G G G T C T C G C C C T C T C T C T C G C	140	
P4BSF 03-G10	A T C G G G T C T C G C C C T C T C T C T C G C	140	
	140	150	
Wild type			
P1B 01-H1	T G C C A G G C C C T C' T G A T C C A G G	159	
P1B 01-E4	T G C C A G G C C C T C' T G A T C C A G G	160	
P2B 08-H3	T G C C A G G C C C T C' T G A T C C A G G	160	
P3B 13-D10	T G C C A G G C C C T C' T G A T C C A G G	160	
P4B 04-H3	T G C C A G G C C C T C' T G A T C C A G G	160	
P5B 14-C11	T G C C A G G C C C T C' T G A T C C A G G	160	
P4BSF 03-G10	T G C C A G G C C C T C' T G A T C C A G G	160	
	160	170	
Wild type			
P1B 01-H1	C C A G C A C C T A C A C C C A G A C C	179	
P1B 01-E4	C C A G C A C C T A C A C C C A G A C C	180	
P2B 08-H3	C C A G C A C C T A C A C C C A G A C C	180	
P3B 13-D10	C C A G C A C C T A C A C C C A G A C C	180	
P4B 04-H3	C C A G C A C C T A C A C C C A G A C C	180	
P5B 14-C11	C C A G C A C C T A C A C C C A G A C C	180	
P4BSF 03-G10	C C A G C A C C T A C A C C C A G A C C	180	
	180	190	
Wild type			
P1B 01-H1	A A A T A C C C C C A T C G T G C T G G C	199	
P1B 01-E4	A A A T A C C C C C A T C G T G C T G G C	200	
P2B 08-H3	A A A T A C C C C C A T C G T G C T G G C	200	
P3B 13-D10	A A A T A C C C C C A T C G T G C T G G C	200	
P4B 04-H3	A A A T A C C C C C A T C G T G C T G G C	200	
P5B 14-C11	A A A T A C C C C C A T C G T G C T G G C	200	
P4BSF 03-G10	A A A T A C C C C C A T C G T G C T G G C	200	
	200	210	
Wild type			
P1B 01-H1	C C A C G G G C A T T G C T C G G C T T C G	219	
P1B 01-E4	C C A C G G G C A T T G C T C G G C T T C G	220	
P2B 08-H3	C C A C G G G C A T T G C T C G G C T T C G	220	
P3B 13-D10	C C A C G G G C A T T G C T C G G C T T C G	220	
P4B 04-H3	C C A C G G G C A T T G C T C G G C T T C G	220	
P5B 14-C11	C C A C G G G C A T T G C T C G G C T T C G	220	
P4BSF 03-G10	C C A C G G G C A T T G C T C G G C T T C G	220	
	220	230	
Wild type			
P1B 01-H1	A C A A C A T C C T C G G G G T C G A C	239	
P1B 01-E4	A C A A C A T C C T C G G G G T C G A C	240	
P2B 08-H3	A C A A C A T C C T C G G G G T C G A C	240	
P3B 13-D10	A C A A C A T C C T C G G G G T C G A C	240	
P4B 04-H3	A C A A C A T C C T C G G G G T C G A C	240	
P5B 14-C11	A C A A C A T C C T C G G G G T C G A C	240	
P4BSF 03-G10	A C A A C A T C C T C G G G G T C G A C	240	

09/463494

7/13

	240	250	
Wild type			
P1B 01-H1	T A C T G G T T C G G G C A T T T C C C A G	259	
P1B 01-E4	T A C T G G T T C G G G C A T T T C C C A G	260	
P2B 08-H3	T A C T G G T T C G G G C A T T T C C C A G	260	
P3B 13-D10	T A C T G G T T C G G G C A T T T C C C A G	260	
P4B 04-H3	T A C T G G T T C G G G C A T T T C C C A G	260	
P5B 14-C11	T A C T G G T T C G G G C A T T T C C C A G	260	
P4BSF 03-G10	T A C T G G T T C G G G C A T T T C C C A G	260	
	260	270	
Wild type			
P1B 01-H1	C G C C T T G C G C C G T G A C G G T G	279	
P1B 01-E4	C G C C T T G C G C C G T G A C G G T G	280	
P2B 08-H3	C G C C T T G C G C C G T G A C G G T G	280	
P3B 13-D10	C G C C T T G C G C C G T G A C G G T G	280	
P4B 04-H3	C G C C T T G C G C C G T G A C G G T G	280	
P5B 14-C11	C G C C T T G C G C C G T G A C G G T G	280	
P4BSF 03-G10	C G C C T T G C G C C G T G A C G G T G	280	
	280	290	
Wild type			
P1B 01-H1	C C C A G G T C T A C G T C A C C C G A A	299	
P1B 01-E4	C C C A G G T C T A C G T C A C C C G A A	300	
P2B 08-H3	C C C A G G T C T A C G T C A C C C G A A	300	
P3B 13-D10	C C C A G G T C T A C G T C A C C C G A A	300	
P4B 04-H3	C C C A G G T C T A C G T C A C C C G A A	300	
P5B 14-C11	C C C A G G T C T A C G T C A C C C G A A	300	
P4BSF 03-G10	C C C A G G T C T A C G T C A C C C G A A	300	
	300	310	
Wild type			
P1B 01-H1	G T C A G G C C A G T T T G G A C A C C T C	319	
P1B 01-E4	G T C A G G C C A G T T T G G A C A C C T C	320	
P2B 08-H3	G T C A G G C C A G T T T G G A C A C C T C	320	
P3B 13-D10	G T C A G G C C A G T T T G G A C A C C T C	320	
P4B 04-H3	G T C A G G C C A G T T T G G A C A C C T C	320	
P5B 14-C11	G T C A G G C C A G T T T G G A C A C C T C	320	
P4BSF 03-G10	G T C A G G C C A G T T T G G A C A C C T C	320	
	320	330	
Wild type			
P1B 01-H1	G G A A G T C C G C G G C G A G G C A G T	339	
P1B 01-E4	G G A A G T C C G C G G C G A G G C A G T	340	
P2B 08-H3	G G A A G T C C G C G G C G A G G C A G T	340	
P3B 13-D10	G G A A G T C C G C G G C G A G G C A G T	340	
P4B 04-H3	G G A A G T C C G C G G C G A G G C A G T	340	
P5B 14-C11	G G A A G T C C G C G G C G A G G C A G T	340	
P4BSF 03-G10	G G A A G T C C G C G G C G A G G C A G T	340	
	340	350	
Wild type			
P1B 01-H1	T G C T G C A A C A G G T G G A G G G A A	359	
P1B 01-E4	T G C T G C A A C A G G T G G A G G G A A	360	
P2B 08-H3	T G C T G C A A C A G G T G G A G G G A A	360	
P3B 13-D10	T G C T G C A A C A G G T G G A G G G A A	360	
P4B 04-H3	T G C T G C A A C A G G T G G A G G G A A	360	
P5B 14-C11	T G C T G C A A C A G G T G G A G G G A A	360	
P4BSF 03-G10	T G C T G C A A C A G G T G G A G G G A A	360	

09/463494

8/13

		360	370	
Wild type				
P1B 01-H1	A T C G T C G C C C T C A G C G G C C A	379		
P1B 01-E4	A T C G T C G C C C T C A G C G G C C A	380		
P2B 08-H3	A T C G T C G C C C T C A G C G G C C A	380		
P3B 13-D10	A T C G T C G C C C T C A G C G G C C A	380		
P4B 04-H3	A T C G T C G C C C T C A G C G G C C A	380		
P5B 14-C11	A T C G T C G C C C T C A G C G G C C A	380		
P4BSF 03-G10	A T C G T C G C C C T C A G C G G C C A	380		
		380	390	
Wild type				
P1B 01-H1	G C C C C A A G G T C A A C C T G A T C G	399		
P1B 01-E4	G C C C C A A G G T C A A C C T G A T C G	400		
P2B 08-H3	G C C C C A A G G T C A A C C T G A T C G	400		
P3B 13-D10	G C C C C A A G G T C A A C C T G A T C G	400		
P4B 04-H3	G C C C C A A G G T C A A C C T G A T C G	400		
PSB 14-C11	G C C C C A A G G T C A A C C T G A T C G	400		
P4BSF 03-G10	G C C C C A A G G T C A A C C T G A T C G	400		
		400	410	
Wild type				
P1B 01-H1	G C C A C A G C C A C G G C G G G C C G	419		
P1B 01-E4	G C C A C A G C C A C G G C G G G C C G	420		
P2B 08-H3	G C C A C A G C C A C G G C G G G C C G	420		
P3B 13-D10	G C C A C A G C C A C G G C G G G C C G	420		
P4B 04-H3	G C C A C A G C C A C G G C G G G C C G	420		
P5B 14-C11	G C C A C A G C C A C G G C G G G C C G	420		
P4BSF 03-G10	G C C A C A G C C A C G G C G G G C C G	420		
		420	430	
Wild type				
P1B 01-H1	A C C A T C C G C T A C G T C G C C G C	439		
P1B 01-E4	A C C A T C C G C T A C G T C G C C G C	440		
P2B 08-H3	A C C A T C C G C T A C G T C G C C G C	440		
P3B 13-D10	A C C A T C C G C T A C G T C G C C G C	440		
P4B 04-H3	A C C A T C C G C T A C G T C G C C G C	440		
P5B 14-C11	A C C A T C C G C T A C G T C G C C G C	440		
P4BSF 03-G10	A C C A T C C G C T A C G T C G C C G C	440		
		440	450	
Wild type				
P1B 01-H1	C G T A C G T C C C G A C C T G A T C G	459		
P1B 01-E4	C G T A C G T C C C G A C C T G A T C G	460		
P2B 08-H3	C G T A C G T C C C G A C C T G A T C G	460		
P3B 13-D10	C G T A C G T C C C G A C C T G A T C G	460		
P4B 04-H3	C G T A C G T C C C G A C C T G A T C G	460		
P5B 14-C11	C G T A C G T C C C G A C C T G A T C G	460		
P4BSF 03-G10	C G T A C G T C C C G A C C T G A T C G	460		
		460	470	
Wild type				
P1B 01-H1	C T T C C G C C A C C A G C G T C G G C	479		
P1B 01-E4	C T T C C G C C A [T] C A G C G T C G G C	480		
P2B 08-H3	C T T C C G C C A C C A G C G T C G G C	480		
P3B 13-D10	C T T C C G C C A C C A G C G T C G G C	480		
P4B 04-H3	C T T C C G C C A C C A G C G T C G G C	480		
P5B 14-C11	C T T C C G C C A C C A G C G T C G G C	480		
P4BSF 03-G10	C T T C C G C C A C C A G C G T C G G C	480		

09/463494

9/13

	480	490	
Wild type			
P1B 01-H1	G C C C C G C A C A A G G G T T T C G G G A	499	
P1B 01-E4	G C C C C G C A C A A G G G T T T C G G G A	500	
P2B 08-H3	G C C C C G C A C A A G G G T T T C G G G A	500	
P3B 13-D10	G C C C C G C A C A A G G G T T T C G G G A	500	
P4B 04-H3	G C C C C G C A C A A G G G T T T C G G G A	500	
P5B 14-C11	G C C C C G C A C A A G G G T T T C G G G A	500	
P4BSF 03-G10	G C C C C G C A C A A G G G T T T C G G G A	500	
	500	510	
Wild type			
P1B 01-H1	C A C C G C C G A C T T T C C T T G C G C C	519	
P1B 01-E4	C A C C G C C G A C T T T C C T T G C G C C	520	
P2B 08-H3	C A C C G C C G A C T T T C C T T G C G C C	520	
P3B 13-D10	C A C C G C C G A C T T T C C T T G C G C C	520	
P4B 04-H3	C A C C G C C G A C T T T C C T T G C G C C	520	
P5B 14-C11	C A C C G C C G A C T T T C C T T G C G C C	520	
P4BSF 03-G10	C A C C G C C G A C T T T C C T T G C G C C	520	
	520	530	
Wild type			
P1B 01-H1	A G A T C C C A C C G G G T T T C G G G C C	539	
P1B 01-E4	A G A T C C C A C C G G G T T T C G G G C C	540	
P2B 08-H3	A G A T C C C A C C G G G T T T C G G G C C	540	
P3B 13-D10	A G A T C C C A C C G G G T T T C G G G C C	540	
P4B 04-H3	A G A T C C C A C C G G G T T T C G G G C C	540	
P5B 14-C11	A G A T C C C A C C G G G T T T C G G G C C	540	
P4BSF 03-G10	A G A T C C C A C C G G G T T T C G G G C C	540	
	540	550	
Wild type			
P1B 01-E4	G G C G A G G G C A G T C C T C T C C G G	559	
P2B 08-H3	G G C G A G G G C A G T C C T C T C C G G	560	
P3B 13-D10	G G C G A G G G C A G T C C T C T C C G G	560	
P4B 04-H3	G G C G A G G G C A G T C C T C T C C G G	560	
P5B 14-C11	G G C G A G G G C A G T C C T C T C C G G	560	
P4BSF 03-G10	G G C G A G G G C A G T C C T C T C C G G	560	
	560	570	
Wild type			
P1B 01-H1	G C T G G T C A A C A G G C C T C G G C G	579	
P1B 01-E4	G C T G G T C A A C A G G C C T C G G C G	580	
P2B 08-H3	G C T G G T C A A C A G G C C T C G G C G	580	
P3B 13-D10	G C T G G T C A A C A G G C C T C G G C G	580	
P4B 04-H3	G C T G G T C A A C A G G C C T C G G C G	580	
P5B 14-C11	G C T G G T C A A C A G G C C T C G G C G	580	
P4BSF 03-G10	G C T G G T C A A C A G G C C T C G G C G	580	
	580	590	
Wild type			
P1B 01-H1	C G C T G A T C A G G C T T C C T T T C C	599	
P1B 01-E4	C G C T G A T C A G G C T T C C T T T C C	600	
P2B 08-H3	C G C T G A T C A G G C T T C C T T T C C	600	
P3B 13-D10	C G C T G A T C A G G C T T C C T T T C C	600	
P4B 04-H3	C G C T G A T C A G G C T T C C T T T C C	600	
P5B 14-C11	C G C T G A T C A G G C T T C C T T T C C	600	
P4BSF 03-G10	C G C T G A T C A G G C T T C C T T T C C	600	

09/463494

10/13

	600	610	
Wild type			
P1B 01-H1	A G C G G C A G C A C C C G G T A C G C A	619	
P1B 01-E4	A G C G G C G G C A C C C G G T A C G C A	620	
P2B 08-H3	A G C G G C G G C A C C C G G T A C G C A	620	
P3B 13-D10	A G C G G C G G C A C C C G G T A C G C A	620	
P4B 04-H3	A G C G G C G G C A C C C G G T A C G C A	620	
P5B 14-C11	A G C G G C G G C A C C C G G T A C G C A	620	
P4BSF 03-G10	A G C G G C G G C A T C G G T A C G C A	620	
	620	630	
Wild type			
P1B 01-H1	G A A T T T C A C T G G G C T C G C T T G G	639	
P1B 01-E4	G A A T T T C A C T G G G C T C G C T T G G	640	
P2B 08-H3	G A A T T T C A C T G G G C T C G C T T G G	640	
P3B 13-D10	G A A T T T T A C T G G G C T C G C T T G G	640	
P4B 04-H3	G A A T T T T A C T G G G C T C G C T T G G	640	
P5B 14-C11	G A A T T T T A C T G G G C T C G C T T G G	640	
P4BSF 03-G10	G A A T T T T T C T G G G C T C G C T T G G	640	
	640	650	
Wild type			
P1B 01-H1	A G T C G C T G A A C A G C G A G G G G T	659	
P1B 01-E4	A G T C G C T G A A C A G C G A G G G G T	660	
P2B 08-H3	A G T C G C T G A A C A G C G A G G G G T	660	
P3B 13-D10	A G T C G C T G A A C A G C G A G G G G T	660	
P4B 04-H3	A G T C G C T G A A C A G C G A G G G G T	660	
P5B 14-C11	A G T C G C T G A A C A G C G A G G G G T	660	
P4BSF 03-G10	A G T C G C T G A A C A G C G A G G G G T	660	
	660	670	
Wild type			
P1B 01-H1	G C C G C G C G C T T C A A C G C C C A A	679	
P1B 01-E4	G C C G C G C G C T T C A A A C G C C C A A	680	
P2B 08-H3	G C C G C G C G C T T C A A A C G C C C A A	680	
P3B 13-D10	G C C G C G C G C T T C A A A C G C C C A A	680	
P4B 04-H3	G C C G C G C G C T T C A A A C G C C C A A	680	
P5B 14-C11	G C C G C G C G C T T C A A A C G C C C A A	680	
P4BSF 03-G10	G C C G C G C G C T T C A A A C G C C C A A	680	
	680	690	
Wild type			
P1B 01-H1	G T A C C C C G C A G G G G C A T C C C C A	699	
P1B 01-E4	G T A C C C C G C A G G G G C A T C C C C A	700	
P2B 08-H3	G T A C C C C G C A G G G G C A T C C C C A	700	
P3B 13-D10	G T A C C C C G C A G G G G C A T C C C C A	700	
P4B 04-H3	G T A C C C C G C A G G G G C A T C C C C A	700	
P5B 14-C11	G T A C C C C G C A G G G G C A T C C C C A	700	
P4BSF 03-G10	G T A C C C C G C A G G G G C A T C C C C A	700	
	700	710	
Wild type			
P1B 01-H1	C C T C G G C C T G C G G C G A A G G C	719	
P1B 01-E4	C C T C G G C C T G C G G C G A A G G C	720	
P2B 08-H3	C C T C G G C C T G C G G C G A A G G C	720	
P3B 13-D10	C C T C G G C C T G C G G C G A A G G C	720	
P4B 04-H3	C C T C G G C C T G C G G C G A A G G C	720	
P5B 14-C11	C C T C G G C C T G C G G C G A A G G C	720	
P4BSF 03-G10	C C T C G G C C T G C G G C G A A G G C	720	

09/463494

11/13

	720	730	
Wild type			
P1B 01-H1	G C C T A C A A G G G T C A A A C G G G C G T	739	
P1B 01-E4	G C C T A C A A G G G T C A A A C G G G C G T	740	
P2B 08-H3	G C C T A C A A G G G T C A A A C G G G C G T	740	
P3B 13-D10	G C C T A C A A G G G T C A A A C G G G C G T	740	
P4B 04-H3	G C C T A C A A G G G T C A A A C G G G C G T	740	
P5B 14-C11	G C C T A C A A G G G T C A A A C G G G C G T	740	
P4BSF 03-G10	G C C T A C A A G G G T C A A A C G G G C G T	740	
	740	750	
Wild type			
P1B 01-H1	G A G C T A T T A C T C C T G G A G C G	759	
P1B 01-E4	G A G C T A T T A C T C C T G G A G C G	760	
P2B 08-H3	G A G C T A T T A C T C C T G G A G C G	760	
P3B 13-D10	G A G C T A T T A C T C C T G G A G C G	760	
P4B 04-H3	G A G C T A T T A C T C C T G G A G C G	760	
P5B 14-C11	G A G C T A T T A C T C C T G G A G C G	760	
P4BSF 03-G10	G A G C T A T T A C T C C T G G A G C G	760	
	760	770	
Wild type			
P1B 01-H1	G T T C C T C G C G C T G A C C A A C	779	
P1B 01-E4	G T T C C T C G C C G C T G A C C A A C	780	
P2B 08-H3	G T T C C T C G C C G C T G A C C A A C	780	
P3B 13-D10	G T T C C T C G C C G C T G A C C A A C	780	
P4B 04-H3	G T T C C T C G C C G C T G A C C A A C	780	
P5B 14-C11	G T T C C T C G C C G C T G A C C A A C	780	
P4BSF 03-G10	G T T C C T C G C C G C T G A C C A A C	780	
	780	790	
Wild type			
P1B 01-H1	T T C C T C G A T C C G A G C G A C G C	799	
P1B 01-E4	T T C C T C G A T C C G A G C G A C G C	800	
P2B 08-H3	T T C C T C G A T C C G A G C G A C G C	800	
P3B 13-D10	T T C C T C G A T C C G A G C G A C G C	800	
P4B 04-H3	T T C C T C G A T C C G A G C G A C G C	800	
P5B 14-C11	T T C C T C G A T C C G A G C G A C G C	800	
P4BSF 03-G10	T T C C T C G A T C C G A G C G A C G C	800	
	800	810	
Wild type			
P1B 01-H1	C T T C C T C G G C G C C T C G T C G C	819	
P1B 01-E4	C T T C C T C G G C G C C T C G T C G C	820	
P2B 08-H3	C T T C C T C G G C G C C T C G T C G C	820	
P3B 13-D10	C T T C C T C G G C G C C T C G T C G C	820	
P4B 04-H3	C T T C C T C G G C G C C T C G T C G C	820	
P5B 14-C11	C T T C C T C G G C G C C T C G T C G C	820	
P4BSF 03-G10	C T T C C T C G G C G C C T C G T C G C	820	
	820	830	
Wild type			
P1B 01-H1	T G A C C T T C A A G A A C G G C A C C	839	
P1B 01-E4	T G A C C T T C A A G A A C G G C A C C	840	
P2B 08-H3	T G A C C T T C A A G A A C G G C A C C	840	
P3B 13-D10	T G A C C T T C A A G A A C G G C A C C	840	
P4B 04-H3	T G A C C T T C A A G A A C G G C A C C	840	
P5B 14-C11	T G A C C T T C A A G A A C G G C A C C	840	
P4BSF 03-G10	T G A C C T T C A A G A A C G G C A C C	840	

09/463494

12/13

	840	850	
Wild type			
P1B 01-H1	G C C A A C G A C G G C C T G G T C G G	859	
P1B 01-E4	G C C A A C G A C G G C C T G G T C G G	860	
P2B 08-H3	G C C A A C G A C G G C C T G G T C G G	860	
P3B 13-D10	G C C A A C G A C G G C C T G G T C G G	860	
P4B 04-H3	G C C A A C G A C G G C C T G G T C G G	860	
P5B 14-C11	G C C A A C G A C G G C C T G G T C G G	860	
P4BSF 03-G10	G C C A A C G A C G G C C T G G T C G G	860	
	860	870	
Wild type			
P1B 01-H1	C A C C T G C A G T T T C G C A C C T G G	879	
P1B 01-E4	C A C C T G C A G T T T C G C A C C T G G	880	
P2B 08-H3	C A C C T G C A G T T T C G C A C C T G G	880	
P3B 13-D10	C A C C T G C A G T T T C G C A C C T G G	880	
P4B 04-H3	C A C C T G C A G T T T C G C A C C T G G	880	
P5B 14-C11	C A C C T G C A G T T T C G C A C C T G G	880	
P4BSF 03-G10	C A C C T G C A G T T T C G C A C C T G G	880	
	880	890	
Wild type			
P1B 01-H1	G C A T G G T G A T C C C G C G A C A A C	899	
P1B 01-E4	G C A T G G T G A T C C C G C G A C A A C	900	
P2B 08-H3	G C A T G G T G A T C C C G C G A C A A C	900	
P3B 13-D10	G C A T G G T G A T C C C G C G A C A A C	900	
P4B 04-H3	G C A T G G T G A T C C C G C G A C A A C	900	
P5B 14-C11	G C A T G G T G A T C C C G C G A C A A C	900	
P4BSF 03-G10	G C A T G G T G A T C C C G C G A C A A C	900	
	900	910	
Wild type			
P1B 01-H1	T A C C G G A T G A A A C C A C C T G G A	919	
P1B 01-E4	T A C C G G A T G A A A C C A C C T G G A	920	
P2B 08-H3	T A C C G G A T G A A A C C A C C T G G A	920	
P3B 13-D10	T A C C G G A T G A A A C C A C C T G G A	920	
P4B 04-H3	T A C C G G A T G A A A C C A C C T G G A	920	
P5B 14-C11	T A C C G G A T G A A A C C A C C T G G A	920	
P4BSF 03-G10	T A C C G G A T G A A A C C A C C T G G A	920	
	920	930	
Wild type			
P1B 01-H1	C G A G G T G A A C C C A G G T C T T T C G	939	
P1B 01-E4	C G A G G T G A A C C C A G G T C T T T C G	940	
P2B 08-H3	C G A G G T G A A C C C A G G T C T T T C G	940	
P3B 13-D10	C G A G G T G A A C C C A G G T C T T T C G	940	
P4B 04-H3	C G A G G T G A A C C C A G G T C T T T C G	940	
P5B 14-C11	C G A G G T G A A C C C A G G T C T T T C G	940	
P4BSF 03-G10	C G A G G T G A A C C C A G G T C T T T C G	940	
	940	950	
Wild type			
P1B 01-H1	G C C T C A C C C A G C C C T G T T C G A G	959	
P1B 01-E4	G C C T C A C C C A G C C C T G T T C G A G	960	
P2B 08-H3	G C C T C A C C C A G C C C T G T T C G A G	960	
P3B 13-D10	G C C T C A C C C A G C C C T G T T C G A G	960	
P4B 04-H3	G C C T C A C C C A G C C C T G T T C G A G	960	
P5B 14-C11	G C C T C A C C C A G C C C T G T T C G A G	960	
P4BSF 03-G10	G C C T C A C C C A G C C C T G T T C G A G	960	

09/463494

13/13

	960	970	
Wild type			
P1B 01-H1	A C C A G C C C G G T C A G G C G T C T A	979	
P1B 01-E4	A C C A G C C C G G T C A G G C G T C T A	980	
P2B 08-H3	A C C A G C C C G G T C A G G C G T C T A	980	
P3B 13-D10	A C C A G C C C G G T C A G G C G T C T A	980	
P4B 04-H3	A C C A G C C C G G T C A G G C G T C T A	980	
P5B 14-C11	A C C A G C C C G G T C A G G C G T C T A	980	
P4BSF 03-G10	A C C A G C C C G G T C A G G C G T C T A	980	
	980	990	
Wild type			
P1B 01-H1	C C G C C A G C A C G' C C A A C C G C C	999	
P1B 01-E4	C C G C C A G C A C G C C A A C C G C C	1000	
P2B 08-H3	C C G C C A G C A C G C C A A C C G C C	1000	
P3B 13-D10	C C G C C A G C A C G C C A A C C G C C	1000	
P4B 04-H3	C C G C C A G C A C G C C A A C C G C C	1000	
P5B 14-C11	C C G C C A G C A C G C C A A C C G C C	1000	
P4BSF 03-G10	C C G C C A G C A C G C C A A C C G C C	1000	
	1000	1010	
Wild type			
P1B 01-H1	T G A A G A A C G C C A G G C C T G T A G	1019	
P1B 01-E4	T G A A G A A C G C C A G G C C T G T A G	1020	
P2B 08-H3	T G A A G A A C G C C A G G C C T G T A G	1020	
P3B 13-D10	T G A A G A A C G C C A G G C C T G T A G	1020	
P4B 04-H3	T G A A G A A C G C C A G G C C T G T A G	1020	
P5B 14-C11	T G A A G A A C G C C A G G C C T G T A G	1020	
P4BSF 03-G10	T G A A G A A C G C C A G G C C T G T A G	1020	
	1020	1030	
Wild type			
P1B 01-H1	G A C C C C C G G C C G G G G C C T C G G	1039	
P1B 01-E4	G A C C C C C G G C C G G G G C C T C G G	1040	
P2B 08-H3	G A C C C C C G G C C G G G G C C T C G G	1040	
P3B 13-D10	G A C C C C C G G C C G G G G C C T C G G	1040	
P4B 04-H3	G A C C C C C G G C C G G G G C C T C G G	1040	
P5B 14-C11	G A C C C C C G G C C G G G G C C T C G G	1040	
P4BSF 03-G10	G A C C C C C G G C C G G G G C C T C G G	1040	
	1040		
Wild type			
P1B 01-H1	C C C G G G C C C	1047	
P1B 01-E4	C C C G G G C C C	1049	
P2B 08-H3	C C C G G G C C C	1049	
P3B 13-D10	C C C G G G C C C	1049	
P4B 04-H3	C C C G G G C C C [G]	1050	
P5B 14-C11	C C C G G G C C C	1049	
P4BSF 03-G10	C C C G G G C C C	1049	